

Zmiany koncentracji triacylogliceroli, lipidów całkowitych i cholesterolu u myszy pod wpływem witaminy C i stresu

JOLANTA KLUSEK, ADAM KOŁĄTAJ*, GRAŻYNA ŚWIDERSKA-KOŁACZ

Instytut Biologii Akademii Świętokrzyskiej, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków

Klusek J., Kołataj A., Świdarska-Kołacz G.

Influence of some stress factors and vitamin C injections on triglyceride, total lipids and cholesterol concentration in mice

Summary

The injection of vitamin C to 8-week-old mice revealed a decrease of triglyceride level in the liver and muscles. The most marked reaction appeared after a vitamin C injection in combination with immobilization for 48 h. An increase in the total lipid concentration in the all studied organs was confirmed in this animal group.

Key words: triglyceride, cholesterol, vitamin C

Kwas askorbinowy uczestniczy w procesach oksydoredukcyjnych i jako najpowszechniej występujący w organizmie przeciwutleniacz chroni komórki przed szkodliwym działaniem reaktywnych cząsteczek tlenu oraz różnych rodzajów wolnych rodników (1, 23, 24, 29). Właściwy poziom witaminy C wpływa między innymi na regulację koncentracji glukozy we krwi, chroni też adrenalinę i kortyzol przed utlenianiem (7, 10, 11). W związku z powyższym postanowiono określić wpływ witaminy C podawanej w wysokich dawkach w dootrzewnowych iniekcjach na poziom triacylogliceroli, lipidów całkowitych i cholesterolu w wątrobie, nerce i mięśniu myszy laboratoryjnych, a także wpływu tej witaminy na wymienione wskaźniki z jednoczesnym zastosowaniem stresorów fizycznych, takich jak: immobilizacja, głodzenie i ekstremalne temperatury otoczenia.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 60 samcach myszy szczepu swiss, pochodzących z hodowli Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Zwierzęta w wieku 8 tygodni, o średniej masie ciała około 22-24 gramów utrzymywane były w standardowych warunkach hodowli, w pomieszczeniu o temperaturze 22°C i naturalnym fotoperiodyzmie (12 godzin światła i 12 godzin ciemności). Żywność była mieszką przemysłową Murigram (16% białka), wyprodukowaną w Instytucie Parazytologii PAN w Łomnej k. Warszawy, mając zapewniony stały dostęp do wody, a także fachową opiekę weterynaryjną.

Kwas askorbinowy (witaminę C) – produkcji Polfa (Warszawa) – podawano 50 myszom podzielonym na grupy eksperymentalne, losowo wybranym z hodowanej populacji oraz 10 myszom kontrolnym. Iniekcji dokonywano do-

otrzewnowo w okresie trzech kolejnych dni, zawsze o tej samej porze doby, 9⁰⁰-10⁰⁰. Zwierzęta podzielono na grupę kontrolną i 5 grup doświadczalnych: I grupa – kontrolna, iniekcja 0,9% NaCl; II grupa – iniekcja witaminy C w dawce 250 µg/g masy ciała w 250 µl roztworu 0,9% NaCl; III grupa – iniekcja witaminy C i okres 48 godzin przebywania w komorach o temperaturze powietrza +4°C; IV grupa – iniekcja witaminy C i okres 48 godzin przebywania w komorach o temperaturze +40°C; V grupa – iniekcja witaminy C i okres 48 godzin bez pożywienia, przy stałym dostępie do wody; VI grupa – iniekcja witaminy C i okres 48 godzin immobilizacji. Zwierzęta tej grupy przebywały w specjalnie do tego celu skonstruowanych klatkach, dopasowanych do wymiarów ciała, uniemożliwiających ruchy kończyn i tułowia, ale pozwalających na ruchy głową w celu pobierania wody i pożywienia.

Po zakończeniu eksperymentu, tj. po upływie 8 godzin od ostatniej iniekcji wszystkie zwierzęta kontrolne i doświadczalne poddane zostały dekapitacji. Natychmiast izolowano wątrobę, nerkę i mięsień czworogłowy lewego uda. Wątrobę i nerkę poddawano perfuzji oziębionym do +4°C roztworem soli fizjologicznej w celu usunięcia krwi. Homogenizację przeprowadzano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4 w homogenizatorze Pottera z teflonowym tłokiem. Homogenaty wirowano w okresie 10 minut przy 12 tysiącach obrotów/min. w wirówce Janetzkiego K-24. Zarówno homogenizację, jak i wirowanie przeprowadzono w chłodni, w temperaturze +4°C. W supernatantach wątroby, nerki i mięśnia oznaczono koncentrację triacylogliceroli, lipidów całkowitych i cholesterolu (µmol/g tkanki) metodą spektrofotokolorymetryczną na aparacie Specol, przy użyciu gotowych testów firmy Bio-La-Test (Polska). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Uzyskane dane zebrano w tab. 1. Dootrzewnowa iniekcja witaminy C nie wpłynęła istotnie na poziom lipidów całkowitych i cholesterolu w badanych organach myszy. Badania wykazały niewielki wzrost ich zawartości zarówno we wszystkich badanych grupach zwierząt, jak i we wszystkich tkankach, jednak żadna z tych zmian nie była istotna statystycznie. Istotny spadek poziomu dotyczył tylko triacylogliceroli. Nastąpił on w wątrobie i mięśni po iniekcji kwasu askorbino-owego i wynosił odpowiednio 87,0% i 86,8% w porównaniu z grupą kontrolną.

Istotny statystycznie wzrost poziomu lipidów całkowitych stwierdzono natomiast u myszy otrzymujących witaminę C i poddanych immobilizacji. W porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej był on w wątrobie o 127,5% wyższy, w nerce – o 129,5% i o 130,4% – w mięśni.

Istotne statystycznie zwiększenie poziomu cholesterolu stwierdzono jedynie w mięśni po głodzeniu i zastosowaniu witaminy C (126,1%). Natomiast zawartość triacylogliceroli wzrosła istotnie w wątrobie do 128,7% wartości kontrolnej u myszy poddanych im-

obilizacji i działaniu witaminy C oraz w nerce zwierząt otrzymujących witaminę i poddanych wysokiej temperaturze (40°C) otoczenia (131,2%).

Każda reakcja przystosowawcza organizmu zwierząt wiąże się z wydatkiem energetycznym, który następnie jest odtwarzany w procesach metabolicznych, gdy czynnik stresujący przestanie działać. Reakcje przystosowawcze rozpoczynające się zaraz po przyjęciu właściwego bodźca prowadzą z reguły do aktywacji hormonów, m.in. rdzenia i kory nadnerczy, które z kolei realizują właściwy przebieg reakcji stresowej. Odbywa się to, między innymi, poprzez aktywację substratów energetycznych, przede wszystkim glukozy oraz kwasów tłuszczowych, a w momentach krytycznych mobilizacji nawet własnego białka strukturalnego. Właśnie także na tym tle gospodarka tłuszczowcami staje się tematem wielu badań fizjologii i biochemii środowiskowej (5, 6, 15, 16).

Przypuszczano od dawna, że w stanie istotnego zapotrzebowania na energię organizm może intensywniej wykorzystywać niektóre tłuszczowce w celu uzyskania energii do koniecznej adaptacji (8, 25). Obserwacje własne nie potwierdziły zdecydowanie tych sug-

gestii. Świadczą o tym w zasadzie niewielkie zmiany koncentracji badanych wskaźników po zastosowaniu zarówno samego kwasu askorbino-owego, jak i w połączeniu z zespołem stresorów.

Przyjmuje się, że witamina C uczestniczy w wielu reakcjach adaptacyjnych organizmu, wpływając też istotnie na poziom niektórych tłuszczowców w ustroju (2, 5, 12, 14, 17, 25). Wydaje się, że kwas askorbino-owy może aktywować procesy lipolizy, na co wskazuje spadek koncentracji triacylogliceroli w wątrobie i mięśni czworogłowym myszy. Podobne wyniki uzyskał Hamilton (9), podając przez 6 tygodni kwas askorbino-owy dorosłym mężczyznom, oraz Vasavi i wsp. (26) w badaniach na szczurach. Zastosowana witamina nie miała natomiast istotnego wpływu na badaną koncentrację lipidów całkowitych i cholesterolu.

Pozbawienie zwierząt możliwości ruchu czy dostępu do pożywienia od dawna uważane były za jedne z najsilniej działających stresorów i wywoływały istotne zmiany mię-

Tab. 1. Zmiany poziomu lipidów całkowitych, cholesterolu i triacylogliceroli ($\mu\text{mol/g}$ tkan-ki) w wątrobie, nerce i mięśni myszy pod wpływem witaminy C i stresu ($n = 10$; $\bar{x} \pm s$)

Wskaźnik	Wątroba		Nerka		Mięsień czworogłowy	
Lipidy całkowite						
Kontrola	8,6 \pm 1,5	100,0	6,8 \pm 1,0	100,0	6,7 \pm 1,3	100,0
Witamina C	9,0 \pm 1,4	104,7	7,3 \pm 1,1	106,3	7,0 \pm 1,7	105,1
Wit. C + 4°C	7,9 \pm 1,8	91,1	7,7 \pm 3,6	111,9	8,0 \pm 2,4	120,4
Wit. C + 40°C	8,8 \pm 2,4	102,3	8,2 \pm 2,4	120,3	7,4 \pm 2,5	111,3
Wit. C + głodzenie	9,7 \pm 3,9	112,3	8,0 \pm 2,5	116,6	6,1 \pm 0,9	92,0
Wit. C + immobilizacja	11,0* \pm 3,2	127,5	8,9* \pm 2,4	129,5	8,7* \pm 3,2	130,4
Cholesterol						
Kontrola	8,4 \pm 1,0	100,0	6,7 \pm 1,3	100,0	5,1 \pm 1,0	100,0
Witamina C	9,1 \pm 2,4	108,9	6,8 \pm 0,9	101,1	5,4 \pm 0,9	106,7
Wit. C + 4°C	10,3 \pm 2,3	122,9	7,5 \pm 0,9	111,3	5,8 \pm 1,3	115,3
Wit. C + 40°C	8,6 \pm 2,7	102,4	7,3 \pm 1,9	108,9	6,1 \pm 2,0	120,2
Wit. C + głodzenie	8,5 \pm 2,2	100,9	6,1 \pm 2,0	90,9	6,4* \pm 1,3	126,1
Wit. C + immobilizacja	7,1 \pm 1,4	84,2	5,6 \pm 2,1	83,4	5,6 \pm 2,1	111,3
Triacyloglicerole						
Kontrola	14,4 \pm 3,6	100,0	5,7 \pm 0,8	100,0	5,6 \pm 2,1	100,0
Witamina C	12,6* \pm 1,5	87,0	5,9 \pm 0,89	103,3	4,9* \pm 0,9	86,8
Wit. C + 4°C	15,0 \pm 3,0	104,2	7,1 \pm 2,2	123,2	6,9 \pm 1,5	122,1
Wit. C + 40°C	17,6 \pm 3,0	121,8	7,5* \pm 1,5	131,2	6,1 \pm 2,5	108,5
Wit. C + głodzenie	17,6 \pm 5,5	121,8	6,8 \pm 0,3	119,3	5,9 \pm 1,9	105,3
Wit. C + immobilizacja	18,6* \pm 7,1	128,7	6,7 \pm 2,4	116,1	5,7 \pm 2,1	102,3

Objaśnienie: * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą

dzy innymi w gospodarce energetycznej ustroju (13, 19, 28). Połączenie działania nadmiaru kwasu askorbinowego z immobilizacją i głodzeniem zwierząt ujawniło istotny wzrost poziomu badanych triacylogliceroli w wątrobie, a lipidów całkowitych – w wątrobie, nerce i mięśni. Podwyższenie koncentracji triacylogliceroli widoczne w wątrobie świadczyć może o intensyfikacji metabolizmu na szlakach nieoksydacyjnych, tj. estyfikacji wolnych kwasów tłuszczowych (3, 4, 12, 21, 30), a tym samym być wynikiem aktywacji układu adrenergicznego i akumulacji tych związków w badanych tkankach.

Wysoka temperatura otoczenia połączona z iniekcją kwasu askorbinowego okazała się mniej skutecznym stresem, gdyż tylko w nerce podwyższył się poziom jedynie triacylogliceroli. W obecności nadmiaru kwasu askorbinowego, przy jednoczesnej ekspozycji zwierząt na gorąco wzmagać się może tempo metabolizmu tłuszczowców poprzez aktywację procesów lipogenezy. Interesująca wydaje się również współzależność między zastosowaną iniekcją witaminy połączoną z głodzeniem zwierząt a istotnym wzrostem koncentracji cholesterolu w mięśni. Cholesterol nie jest wprawdzie substratem energetycznym dla komórki, ale podczas reakcji stresowej może być intensywniej wykorzystywany jako prekursor hormonów kory nadnerczy. Ta podwyższona cholesterogeneza może być spowodowana efektywniejszym działaniem HMG-CoA reduktazy oraz obniżoną degradacją cholesterolu do kwasów żółciowych. O związku witaminy C z regulacją produkcji cholesterolu w wątrobie, jego przemianach w składniki żółciowe i wpływie na poziom cholesterolu frakcji LDL i HDL mówią dane piśmiennictwa (18, 20, 22, 25).

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można przypuszczać, że witamina C podawana zwierzętom profilaktycznie przed lub podczas działania silnego stresora środowiskowego pozwala na zwiększenie zakresu odporności stresowej.

Piśmiennictwo

- Amer M. A.: Modulation of age-related biochemical changes and oxidative stress by vitamin C and glutathione supplementation in old rats. *Ann. Nutr. Metab.* 2002, 46, 165-168.
- Alwan C. L., Brown A. J., Cooper U. A., Sammans S.: The role of ascorbic acid in the mosaic of coronary heart disease: Lipid metabolism and antioxidant functions. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1999, 26, 85-99.
- Babu J. R., Sundravel S., Arumugam G., Renuka R., Deepa N., Sachdanandam P.: Salubrious effect of vitamin C and vitamin E on tamoxifen-treated women in breast cancer with reference to plasma lipid and lipoprotein levels. *Cancer Lett.* 2000, 151, 1-5.
- Bodzek P., Wielkoszyński T., Zamlyński J., Koziol M., Manka G., Strojek K.: The estimation of L-ascorbic acid serum concentration and selected parameters of metabolism of serum lipids in pregnant women with diabetes. *Ginek. Pol.* 1999, 70, 667-671.
- Cassader M., Gambino R., Ruiu G., Marena S., Bodoni S., Pagano G.: Postprandial triglyceride-rich lipoprotein changes in elderly and young subjects. *Aging (Milano)* 1996, 8, 421-428.
- Couillard C., Bergeron N., Prudhomme D., Bergeron J., Tremblay A., Bouchard C., Mauriege P., Despres J. P.: Postprandial triglyceride responds in visceral obesity in men. *Diabetes* 1998, 47, 953-960.
- Figuera M. R., Queiroz C. M., Stracke M. P., Brauer M. C. N., Frussa R., Wajner M., de Mello C.: Ascorbic acid, α -tocopherol attenuate methyl-malonic acid-induced convulsion. *Neuroreport* 1999, 10, 2039-2051.
- Gribanov G. A., Kostiuk N. V., Abramov V., Bykov V. A., Rebrov L. B., Volodina T. V., Pertsov S. S.: Lipid parameters of the skin, cerebellum, and modulla oblongata during immersion stress in rats. *Voprosy Medicinskoj Chimii* 1999, 45, 131-135.
- Hamilton I. M., Gilmore W. S., Benzie I. F., Mulholland C. W., Strain J. J.: Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br. J. Nutr.* 2000, 84, 261-267.
- Hanashima C., Namiki H.: Cytotoxic and growth inhibitory effect of ascorbic acid on cultured bovine vascular endothelial cells. *Zoolog. Sci.* 1999, 19, 99-105.
- Kall M. A., Anderson C.: Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food biological samples. *J. Chromat.* 1999, 730, 101-113.
- Khajehdehi P.: Effect of vitamins on the lipid profile of patients on regular hemodialysis. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2000, 34, 62-66.
- Klusek J., Kolaťaj A., Świdorska-Kolacz G.: The influence of starvation on the level of some lipids on pigs. *Arch. Tierzucht* 40, 1997, 365-369.
- Kontush A., Mann U., Arlt S., Ujeyl A., Luhrs C., Muller-Thomsen T., Beisiegel U.: Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 345-354.
- Mensenkamp A. R., Jong M. C., van Goor H., van Luyn M. J., Bloks V., Havinga R., Voshal P. J., Hofker M. H., van Dijk K. W., Havckes L. M., Kuipers F.: Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein triglyceride secretion by the liver. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 35711-35718.
- Miachon S., Jouvenet M., Vallon J. J.: Cholesterol and triglyceride levels in the serum of muricidal male Wistar indices of mitochondrial benzodiazepine receptors? *Brain Res. Bull.* 2000, 51, 57-61.
- Rifjci V. A., Khachadurian A. K.: Effects of dietary vitamin C and E supplementation on the copper media oxidation of HDL and on HDL mediated cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 1996, 27, 19-26.
- Rodriguez J. A., Grau A., Eguinoa E., Nespereira B., Perez-Illzarbe M., Arias R., Belzunce M. S., Paramo J. A., Martinez-Caro D.: Dietary supplementation with vitamins C and E prevents down regulation of endothelial NOS expression in hypercholesterolemia in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 2002, 165, 33-40.
- Ruiz de Gordoa J. C., Santafe J., Segerra Domenech J., Santisteban A.: Modification of rat plasma lipoproteins induced by acute immobilization stress. *Psychosom. Med.* 1994, 56, 486-492.
- Sahin K., Sahin N., Yaralioglu S.: Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum metabolites, and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biol. Trace. Elem. Res.* 2002, 85, 35-45.
- Sahin K., Kucuk O., Sahin N., Sari M.: Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation status, serum hormone, metabolite, and mineral concentrations of Japanese quails reared under heat stress (34 degrees C). *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2002, 72, 91-100.
- Scott J.: Heart disease – Good cholesterol news. *Nature* 1999, 40, 816-819.
- Singhal S., Gupta R., Goyle A.: Comparison of antioxidant efficiency of vitamin E, vitamin C, vitamin A and fruits in coronary heart disease: a controlled trial. *J. Assoc. Phys. India* 2001, 49, 327-331.
- Stein J. H., Carlsson C. M., Papcke-Benson K., Aeschlimann S. E., Bode-mer A., Carnes M., McBride P. E.: The effects of lipid-lowering and antioxidant vitamin therapies on flow-mediated vasodilation of the brachial artery in older adults with hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001, 38, 1806-1813.
- Tofler G. H., Stee J. J., Stubbe J., Beadle J., Feng D., Lipinska I., Taylor A.: The effect of vitamin C supplementation on coagulability and lipid levels in healthy male subjects. *Thromb. Res.* 2000, 100, 35-41.
- Vasavi H., Thangaraju M., Babu J. R., Sachdanandam P.: The salubrious effects of ascorbic acid on cyclophosphamide instigated lipid abnormalities in fibrosarcoma bearing rats. *Cancer Biochem. Biophys.* 1998, 16, 71-83.
- Velde M. Van de, De Wolff M., Leather H. A., Wouters P. I.: Effect of lipids on the functional and metabolic recovery from global myocardial study of isolated rabbit hearts. *Cardiovascular Res.* 2000, 48, 129-137.
- Waheeda A. A., Yasuzumi F., Gupta P. D.: Lipid and fatty acid composition of brush border membrane of rat intestine during starvation. *Lipids* 1998, 11, 1093-1097.
- Warwick G. L., Waller H., Ferns G. A.: Antioxidant vitamin concentrations and LDL oxidation in nephrotic syndrome. *Ann. Clin. Biochem.* 2000, 37, 488-491.
- Yilmaz O., Ozkan Y., Yildirim M., Ozturk A. I., Ersan Y.: Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione, malonaldehyde, and fatty acids levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats. *J. Cell Biochem.* 2002, 86, 530-539.