

TADEUSZ MIERZEJEWSKI

Aktywność lipolityczna osocza w doświadczalnej arteriosklerozie kogutów

Z Zakładu Biochemii Instytutu Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Pogląd, że hiperlipemia, w zależności od genetycznego uwarunkowania, prowadzi z czasem do miejscowych zmian zwyrodnieniowych w ścianach naczyń tętniczych, poparło doświadczalnie wielu autorów (1, 4, 6, 8—11, 13, 25, 26). Toteż w badaniach nad patogenezą miażdżycy u człowieka i arteriosklerozy u zwierząt, poświęcono szereg prac przemianie tłuszczowej.

O aktywności enzymów działających na metabolizm estrów kwasów tłuszczowych w osoczu lub surowicy krwi, wątrobie i ścianie aorty człowieka i zwierząt doświadczalnych, informują liczne prace (2, 3, 5, 14—16, 18—23, 28, 30).

Niewiele jest jednak wiadomo o aktywności lipolitycznej osocza w procesie narastającej lipemii u kogutów rasy „zielononóżka”, które, jak wykazały badania Kądziołki i wsp. (10, 11, 26), cechuje duża podatność do samoistnej i doświadczalnie wywołanej arteriosklerozy.

Wysokokaloryczna, miażdżycotwórcza karma, wywoływała u tych ptaków hiperlipemię, a następnie zmiany proliferacyjno-zwyrodnieniowe w błonie wewnętrznej i środkowej tętnicy głównej i naczyniach wieńcowych serca.

W niniejszej pracy podjęto badania, których celem była rejestracja zmian aktywności układu lipolitycznego osocza w czasie narastającej lipemii u kogutów rasy „zielononóżka” żywionych bogatotłuszczową — miażdżycotwórczą karmą.

Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzono na 17 kogutach w wieku jednego roku, rasy „zielononóżka”. Ptaki trzymano w zamknięciu, żywiono *ad libitum* pszenicą i mieszanką zawierającą składniki mineralno-witaminowe. Pięć kogutów stanowiło grupę kontrolną — 0, a pozostałe dwanaście, stanowiące grupę doświadczalną — D, otrzymywały codziennie, bezpośrednio do wola, pigułkę zawierającą 250 mg cholesterolu i 1000 mg smalcu wieprzowego w mące pszennej jako zaróbce. Po upływie 21 dni żywienia w/w karmą, a następnie w 21 dniowych odstępach skrwawiano całkowicie po 3 koguty z grupy D. Krew pobierano bezpośrednio z serca do probówek z dodatkiem krystalicznej heparyny (Heparin B.P. Baots pure drug CO.LTD) 0,25 mg — 25,4 I.U. na 25 ml pełnej krwi.

Równocześnie z pierwszym skrwawieniem kogutów grupy D, pobrano krew od kogutów grupy O.

W osoczu oznaczano tłuszcz całkowity (TC) metodą Swana (29), a z wielu metod (12, 15, 21, 24, 27, 31), stosowanych w celu określenia aktywności hydrolaz estrów kwasów tłuszczowych wybrano metodę opracowaną przez Śliwińską (12).

Za jednostkę aktywności lipolitycznej w osoczu = ILp, przyjęto proponowaną przez Śliwińską jednostkę dla lipazy t.j. 0,1 ml 0,01 N NaOH.

Aktywność lipolityczną osocza = ALpO, wyrażono w ILp/100 ml osocza/godzinę.

Dokładność metody sprawdzono przeprowadzając 10 oznaczeń tej samej próbki. Współczynnik zmienności tych wyników wynosił 8,3%. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono trzykrotnie. Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną oznaczeń.

Wyniki i omówienie

Podano w tab. 1 i ryc. 1. Zestawione w tab. 1 wyniki oznaczeń informują, że:

Tab. 1. Średnie wartości: stężenia nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych = NTK w układzie kontrolnym (*), oraz tłuszczu całkowitego = TC i aktywności lipolitycznej = ALpO w osoczu kogutów grupy O i D (liczby 21 ... 84, oznaczają dzień doświadczenia)

	G		R		U		P		A	
	0	D-21	D-42	D-63	D-84	D-105	D-126	D-147	D-168	D-189
Liczba zwierząt	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Liczba oznaczeń	15	9	9	9	9	9	9	9	9	9
NTK - $\mu\text{M NaOH}/100\text{ ml}$ układu	60	68	57	65	65	65	65	65	65	65
Odczylenie średnie	± 5	± 2	± 3	± 5	± 5	± 5	± 5	± 5	± 5	± 5
%	100	113,3	95	108,3	108,3	108,3	108,3	108,3	108,3	108,3
TC - mg %	366	480	548	726	830	830	830	830	830	830
Odczylenie średnie	± 52	± 34	± 28	± 40	± 46	± 46	± 46	± 46	± 46	± 46
%	100	133,3	152,2	200,0	230,6	230,6	230,6	230,6	230,6	230,6
ALpO - ILp/100 ml/godz.	50	20	20	43	65	65	65	65	65	65
Odczylenie średnie	± 3	± 1	± 2	± 3	± 5	± 5	± 5	± 5	± 5	± 5
%	100	40	40	86	130	130	130	130	130	130

Objaśnienia: *) = suma NTK preinkubowanego (5 min. w 37°C) osocza oraz inkubowanego (1 godz. w 37°C) substratu. Wynik wyrażono w $\mu\text{M NaOH}$ po przeliczeniu na 100 ml układu kontrolnego.

1. Bogatotłuszczowa — miażdżycotwórcza karma, podawana kogutom przez 84 dni powodowała wyraźny narastający w czasie wzrost stężenia tłuszczowców — TC w ich osoczu.

2. Osocze kogutów grup O i D zawierało układ enzymatyczny katalizujący reakcję hydrolizy estrów kwasów tłuszczowych, którego aktywność można było oznaczyć przez miareczkowanie zasadą sodową — kwasów, uwolnionych z hydrozolu oliwy nicejskiej.

3. ALpO kogutów grupy D zmieniała się w czasie doświadczenia.

Ruch zmian TC i ALpO w grupie D w czasie prowadzonych badań, przy założeniu, że średnie wartości stężenia TC i poziomu ALpO grupy O wynoszą 100%, ilustruje ryc. 1.

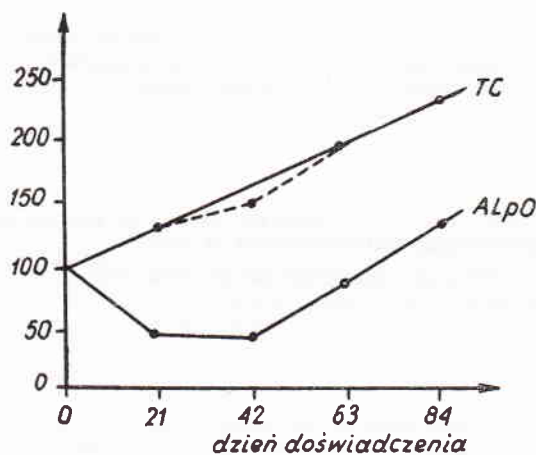
Grafik dla TC, zależny od zawartości tłuszczu w krwi krążącej, ma przebieg charakterystyczny dla proporcjonalnie do czasu narastającej lipemii.

Krzywa dla ALpO i jej przebieg pozwalają stwierdzić, że:

1. ALpO nie koreluje ze stężeniem TC osocza;
2. ALpO spada wybitnie, bo aż o 60% i na tym poziomie utrzymuje się do 42 dnia doświadczenia;
3. po 42 dniach żywienia ptaków bogatotłuszczową karmą zmieniły się warunki w lipolitycznym układzie osocza, wyrażające się stopniowym wzrostem aktywności ALpO, do poziomu przewyższającego o 30% wyjściową aktywność układu, w 84 dniu badań.

W badaniach sekcyjnych nie stwierdzono w czasie prowadzonych doświadczeń zmian proliferacyjno-zwrotności tężnicy głównej. Stwierdzono natomiast, poczynając od 63 dnia badania, cechy tłuszczoczenia wątroby.

Lipazy osocza, obok takich enzymów jak pseudocholesteraza i enzymy krzepnięcia krwi, są aktywnie wydzielane do układu krążenia i służą fizjologicznej funkcji krwi (7).



Ryc. 1. Zmiany stężenia TC i poziomu ALpO w osoczu kogutów grupy D jako funkcja czasu.

Dane piśmiennictwa traktującego o aktywności enzymów hydrolizujących estry kwasów tłuszczowych w osoczu lub surowicy krwi człowieka i zwierząt doświadczalnych są kontrowersyjne. Mair (15, 16) na przykład, w badaniach nad metabolizmem tkanki aorty, oznaczyła w surowicy psa aktywność esterażową obok aktywności lipazy, zaś u człowieka i królika stwierdziła w surowicy krwi jedynie aktywność esteraż oraz całkowity brak aktywności lipazy. Patelski (19, 20, 21) natomiast oznaczał aktywność lipazy zarówno w surowicy krwi ludzi jak i królików.

Ponieważ w niniejszej pracy badano aktywność w niefrakcjonowanym materiale enzymatycznym jakim jest osocze, użyto określenia układ lipolityczny, pomimo zastosowania metody służącej do oznaczania aktywności lipazy; — nie powinno to tworzyć podstaw do kontrowersji, gdyż szerzej ujmując badany proces.

W wyniku działania układu lipolitycznego osocza, zależnie od jego sprawności, uwalniają się różne ilości kwasów tłuszczowych, zarówno *in vivo* jak *in vitro*.

Wykazano (21, 31), że *in vitro* nieestryfikowane kwasy tłuszczowe (NTK) wprowadzone na przykład z osoczem do zamkniętego układu doświadczalnego hamują lipolizę. Wynika z tego, że w układzie takim kierunek i wielkość zmian lipolizy zależne są od stężenia wyjściowego NTK.

Ruch ALpO stwierdzony w niniejszej pracy nie mógł być powodowany jedynie zmianami stężenia NTK w układzie. Wyjściowe stężenia NTK oznaczanych prób przez cały czas prowadzonych badań ulegały niedużym zmianom (od +13% do -5%) i nie korelowały z ALpO ani ujemnie, ani dodatnio (tab. 1). Toteż 60% inhibicja hydrolizy estrów kwasów tłuszczowych, obserwowana 21 i 42 dnia doświadczenia oraz jej wzrost przewyższający 84 dnia badań o 30% aktywność wyjściową ALpO (ryc. 1), powodowane były w lipemicznym osoczu kogutów grupy D innym mechanizmem, niż klasyczna inhibicja enzymu przez produkt.

Patelski i wsp. (22) stwierdzili w surowicy królików, żywionych karmą aterogenną, znamienny wzrost aktywności fosfolipazy A, oraz brak zmian w aktywności lipazy.

Być może, że w procesie narastającej lipemii zmienia się u kogutów wzajemny stosunek ilościowy hydrolaz estrów kwasów tłuszczowych stanowiących układ lipolityczny osocza. Część enzymów tego układu może być zatruwana przez czynniki toksyczne, ulegać inhibicji przez substrat lub produkt, względnie z powodu braku aktywatorów nie przechodzić z proenzymu w aktywny ferment.

Nie negując w/w możliwości należy przyjąć, że na wyniki ALpO otrzymane w niniejszych badaniach rzutuje w głównej mierze aktywność lipazy trójglicerydowej (LTG). Za wnioskiem tym przemawiają następujące stwierdzenia: 1) substrat wysycający oznaczany układ (oliwa z oliwek), stosowany jest do oznaczania aktywności lipazy trójglicerydowej (7, 12, 21); 2) wyniki poziomu ALpO otrzymywano z różnicy stężenia NTK układu badanego i układów kontrolnych (NTK substratu i NTK osocza); 3) oznaczono małe odchylenia w stężeniu NTK (od +13% do -5%) od wartości wyjściowej w układach kontrolnych dla samego osocza i samego substratu. W ten sposób LTG byłaby czynnikiem ograniczającym lub akcelerującym ALpO w warunkach prowadzonych oznaczeń.

LTG kontrolowana jest ilościowo przez cykliczny AMP (kwas adenozyńnojednofosforowy), który konwertuje nieaktywny enzym w aktywną lipazę (7). Oznacza to, że procesy, które stymulują lub hamują syntezę cyklicznego AMP, wpływają na lipolizę.

Powstawanie cyklicznego AMP z ATP (kwas adenozyńnotrójfosforowy) stymuluje kilka hormonów i neurohormonów, głównie adrenalina, noradrenalina i glukagon (7).

Niekorelujące z poziomem lipidów we krwi zmiany aktywności transaminaz stwierdziliśmy w osoczu kogutów pozostających na diecie miodzycotwórczej (17). Przypuszczaliśmy, że ruch aktywności tych enzymów był zjawiskiem wtórnym stressu metabolicznego, ponieważ 250 mg cholesterolu i 1000 mg smalcu, podawane codziennie kogutom o wadze 1,8—2,0 kg, pomimo szybkiej przemiany materii u ptaków, stanowi znaczne przeciążenie ich organizmu. Komórki, w pierwszym rzędzie wątroby, a następnie innych tkanek, zmuszone zostają do prowadzenia bardzo intensywnych procesów katabolicznych i anabolicznych tłuszczowców. Narusza to normalny tok przemian i wprowadza ustrój w stan metabolicznego stressu.

W stanie stressu metabolicznego mechanizm zmian ALpO, stwierdzony w niniejszej pracy, można by tłumaczyć następująco: w celu rozmieszczenia i spalania nadmiaru wprowadzonych z pokarmem tłuszczowców dochodzi do wzmożonego katabolizmu cukrów. W procesach glikogeno- i glikolizy, zaangażowane są hormony glukagon i adrenalina, ATP i cykliczny AMP. W wyniku zaangażowania tych hormonów i kwasów adenozyńnofosforowych, LTG konwertowana jest w aktywny enzym w mniejszym stopniu; — wyrazem tego

jest zaniżony poziom ALpO (21 i 42 dzień doświadczenia, poziom TC 133—152%, ALpO 40%, a w badaniach sekcyjnych nie stwierdzono zmian przemawiających za stłuszczeniem wątroby i arteriosklerozą tętnicy głównej). W następstwie zwolnienia procesów glikogeno- i glikolizy, powstały z ATP cykliczny AMP pobierany jest w mniejszym stopniu przez enzymy układu katabolizującego cukry; w efekcie LTG konwertowana jest w aktywną lipazę w większej ilości i powoduje wzrost ALpO (63 i 84 dzień badań, stężenie TC 200—230%, aktywność ALpO 86—130%, sekcyjnie cechy zmian stłuszczenia wątroby, makroskopowo brak zmian proliferacyjno-zwyrodnieniowych w tętnicy głównej).

Przeprowadzone badania nie upoważniają do kategorycznego stwierdzenia, jaki mechanizm decyduje o zmianach ALpO; — pozwalają natomiast stwierdzić, że przeciążenie ustroju kogutów pokarmem tłuszczowym prowadzi do zmian aktywności układu lipolitycznego osocza. Obniżony poziom ALpO przy procentowo niewysokiej lipemii jest sygnałem wyprzedzającym późniejsze stłuszczenie wątroby; wtedy poziom ALpO jest w granicach normy lub ją przewyższa i znacznie wzrasta stężenie TC we krwi krążącej.

W związku z tym badanie aktywności układu lipolitycznego w niefrakcjonowanym osoczu krwi *in vitro* może być przydatne poprzez ocenę jego sprawności w diagnozowaniu wczesnych stanów, prowadzących do stłuszczenia wątroby.

Piśmiennictwo

- Adams C. W. M.: Biol. Rev. 39, 372, 1964.
- Adams C. W. M., Abdulla Y. H., Bayliss O. B., Morgan R. S.: J. Path. Bact. 94, 77, 1967.
- Day A. J., Gould-Hurst P. R. S.: Biochim. biophys. Acta 116, 169, 1966.
- Detweiler K. K., Luginbühl H.: Arteriosclerosis in animals 16-th Hahnemann Symposium on Artherosclerotic Vascular Disease. N. York, 1966.
- Eisenberg S., Stein Y., Stein O.: Biochim. biophys. Acta 164, 205, 1968.
- Grünberg W.: Dt. tierärztl. Wschr. 68, 715, 1961.
- Harper H. A.: Zarys chemii fizjologicznej. PZWL 1972.
- Hasik J.: Pol. Tyg. lek. 23, 733, 1968.
- Katz L. N., Stamler J., Pick R.: Nutrition and arteriosclerosis. Philadelphia 1958.
- Kądziołka A., Kostarz T., Ruciński T.: Annals Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. DD 24, 313, 1968.
- Kądziołka A., Kostarz T., Pruszkowska R., Ruciński T.: Pol. Arch. wet. 12, 1, 1969.
- Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice. PZWL, 1969.
- Król W., Konturek S.: Pol. med. J. 4, 355, 1965.
- Korn E. D.: J. biol. Chem. 1, 215, 1955.
- Maier N., Haimovič H.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 118, 258, 1965.
- Maier N.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 655, 1968.
- Mierzejewski T., Truchliński J.: Medycyna wet. 29, 613, 1973.
- Patelski J.: Esteraza cholesterolowa tętnicy głównej. PZWL 1964.
- Patelski J., Waligóra Z., Szulc S.: J. Atheroscler. Res. 7, 453, 1967.
- Patelski J., Bowyer D. E., Howard A. N., Gresham G. A.: J. Atheroscler. Res. 8, 221, 1968.
- Patelski J., Pniewska B., Szulc S., Waligóra Z.: Diag. Lab. 4, 131, 1968.
- Patelski J., Bowyer D. E., Howard I. W. i wsp.: Atherosclerosis 12, 41, 1970.
- Patelski J., Waligóra Z., Szulc S.: Enzyme 12, 299, 1971.
- Ravin H. A., Seligman A. M.: Archs Biochem. Biophys. 42, 337, 1953.
- Rożynkowska D.: Pol. Arch. Med. wew. 35, 1387, 1965.
- Rubaj B., Kądziołka A.: Fol. Soc. Sci. Lublinensis Sect. A—D 9/10, 91, 1970.
- Seligman A. M., Nachlos M. M.: J. clin. Invest. 29, 31, 1950.
- Smith E. B.: J. Atheroscler. Res. 5, 224, 1965.
- Swahn B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 9, 1953.
- Szulc S.: Poznańskie Tow. Przyjaciół Nauk 37, 229, 1968.
- Waligóra Z., Patelski J., Szulc S., Trzeciak W.: Diag. Lab. 4, 237, 1968.

Adres autora: doc. dr habil. Tadeusz Mierzejewski, Langiewicza 3A/37, 20-032 Lublin.

Межеевски Т. — Липолитическая активность плазмы крови при экспериментальном артериосклерозе петухов.

У петухов, выдержанных 84 дня на богатой в жир, вызывающей артериосклероз диете, появился пропорциональный до времени откорма рост содержания липоидов в крови, который не проходил в корреляции с изменениями липолитической активности их плазмы. В начальном периоде кормления, при концентрации липоидов в крови доходящей до 152% их исходного уровня, липолитическая активность плазмы крови была понижена до 60% исходного уровня и содержалась на этом уровне на протяжении 42 дней применения артериосклерородной диеты. После этого периода, при уровне липоидов равняющемся 200—230%, наступил рост липолитической активности плазмы крови до исходного уровня а потом, на 84 день эксперимента, до уровня превышающего исходный уровень на 30%.

Автор полагает, что исследование активности липолитического аппарата в нефракционированной плазме крови *in vitro* может быть полезно, путем оценки его функциональной способности, для диагноза ранних состояний организма ведущих до ожирения печени.

Mierzejewski T. — Lipolytic activity of plasma in the experimental arteriosclerosis of cocks.

In the cocks being fed for 84 days with special fodder containing a large amount of fat there appeared along with the time of feeding an increase of the concentration of fat in the blood, but there was not noticed any correlation with the changes in the lipolytic activity of plasma. At the beginning of feeding, when the concentration of fat compounds was 152% of the normal level, the lipolytic activity decreased at about 60% and maintained at the same level for 42 days. Then, at the concentration of fat compounds reaching 200—230% there was an increase of plasma lipolytic activity up to 30% compared with the normal activity, which had been observed at the beginning of the experiment. The examination of the lipolytic activity in the plasma *in vitro* may be useful in the diagnostics of early states leading to liver steatosis.

LEE Y.: Obserwacje kliniczne nad zastosowaniem tiamylalu sodowego z fentanyl-droperidolem jako środka służącego do narkozy u psów. (Clinical observations on the use of thiamylal sodium with fentanyl-droperidol as an anesthetic in dogs). Vet. medicine small animal. clin. 68, 738—739, 1973 (7).

Fentanyl-droperidol sam względnie w połączeniu z tiamylalem sodowym jest często stosowany do uzyskiwania narkozy. Badania przeprowadzono na psach w wieku 3 tygodni do 15 lat. U 150 sztuk stosowano innovarvet (0,4 mg fentanylu, 20 mg droperidolu) na 15—20 funtów oraz atropinę w ilości 0,02 mg/funt wagi ciała a po 10—15 minutach w razie potrzeby surital. U 118 psów natomiast stosowano dożylnie surital (tiamylal sodowy), a następnie po zniesieniu oddechów gardzielowych Innovar-vet w ilości 1 cm/25—30 funtów i standardową dawkę atropiny. W następstwie stosowania tiamylalu sodowego i fentanyl-droperidolu uzyskiwano głęboką narkozę w ciągu 10—15 minut. U niektórych osobników działanie analgetyczne utrzymywało się nawet przez 60 minut. Podawanie atropiny powodowało wystąpienie arytmii zatokowej a następnie obniżenie ilości skurczów mięśnia sercowego.

G.