

*Renata B. Kostogrys¹, Angelika Manterys², Magdalena Franczyk-Żarów²,
Edyta Maślak³, Adam Florkiewicz⁴, Iwona Wybrańska¹*

WPLYW DIETY NISKOWĘGLOWODANOWEJ I WYSOKOBIAŁKOWEJ (LCHP) NA PARAMETRY WĄTROBOWE SZCZURÓW SZCZEPU WISTAR

¹ Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medium
ul. Kopernika 15A, 31-501 Kraków, Polska

² Katedra Żywienia Człowieka, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy
ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, Polska

³ Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET)
Bobrzyńskiego 14, Kraków, Polska

⁴ Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, Polska
Kierownik: dr hab. n. med. *Bogdan Solnica*

Celem badań było określenie wpływu diety niskowęglowodanowej i wysokobiałkowej na parametry wątrobowe szczurów szczepu Wistar żywionych dietą (LCHP). Wykazano istotny wpływ diety na masę ciała. Dodatkowo u zwierząt otrzymujących dietę LCHP zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost zawartości tłuszczu w badanym narządzie, jak również zmiany w profilu kwasów tłuszczowych.

Hasła kluczowe: dieta LCHP, szczury, zawartość tłuszczu w wątrobie.
Key words: LCHP diet, rats, fat concentration in liver.

Stłuszczenie wątroby jest jednym z najczęstszych schorzeń wątroby. O stłuszczeniu wątroby mówimy w przypadku, kiedy otłuszczone jest więcej niż 50% komórek wątrobowych, bądź gdy zawartość tłuszczu w wątrobie osiąga wartość 5% masy wątroby (1). Często stłuszczenie wątroby występuje jako skutek lub objaw innych chorób. Jest chorobą odwracalną i wprowadzenie odpowiedniego żywienia, a w szczególności wyeliminowanie przyczyn schorzenia jak np. alkoholu, nadwagi może cofnąć zmiany i przywrócić prawidłowe funkcjonowanie wątroby. Leczenie stłuszczenia polega na odstawieniu alkoholu oraz prawidłowym odżywianiu (1, 2).

Tłuszcz zawarty w diecie, w szczególności podwyższone spożycie nasyconych kwasów tłuszczowych i cholesterolu powoduje podniesienie stężenia lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) cholesterolu w surowicy krwi (3). Ponieważ standardowa dieta typu Western (WD) dostarcza 38% kalorii w postaci tłuszczu ogółem (17%

tłuszczu, gł. nasycone kwasy tłuszczowe) i 400 mg cholesterolu na dobę istnieją dowody, że dieta ta powoduje stłuszczenie wątroby (4).

Diety o niskiej zawartości węglowodanów i o wysokiej zawartości białka (LCHP) i ich odmiany (np. dieta Atkinsa) stosowane w redukcji masy ciała mają zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na organizm żywy (5–7). Uważa się, że dieta taka może również mieć związek ze stłuszczeniem wątroby.

Podjęto się więc próby oceny wpływu diety LCHP na masę wątroby u szczurów, zawartość tłuszczu oraz na profil kwasów tłuszczowych w badanym narządzie. Ponieważ ilość i jakość tłuszczu w diecie LCHP była identyczna jak w diecie WD celem doświadczenia było sprawdzenie, czy zwiększenie ilości białka zintensyfikuje wywołane dietą zmiany. Dieta WD stanowiła pozytywną kontrolę w tym doświadczeniu.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniu wykorzystano osiemnaście szczurów szczepu Wistar otrzymanych z Instytutu Zootechniki w Krakowie, ważących średnio 160 g. Szczury przebywały w klatkach z trocinami, z nieograniczonym dostępem do pożywienia oraz wody. Szczury utrzymywano w środowisku o kontrolowanej temperaturze (22–25°C), w cyklu 12-godzinny dzień/noc. Zwierzęta losowo przydzielono do trzech grup doświadczalnych (n=6) i żywiono przez 8 tygodni dietą: I-AIN-93G (kontrola), (wg 8) oraz dietami eksperymentalnymi: II-WD (21% masła, 20% białka) i III-LCHP (21% masła, 52,4% białka). Masa ciała zwierząt była monitorowana co tydzień. Po 8 tygodniach doświadczenia zwierzęta uśpiono, a pobraną wątrobę ważono, następnie próbki zamrożono (-80°) i przechowywano do dalszych analiz.

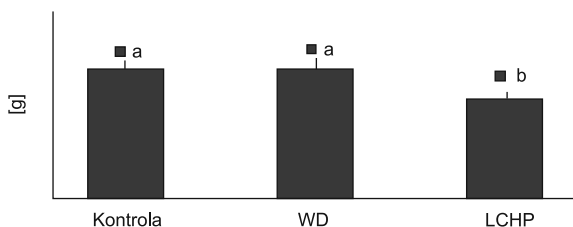
Próbki wątroby (n=6) były analizowane przy użyciu analizatora Soxtec Avanti 2050/LECO TFE 2000. Zasada oznaczenia tłuszczu polegała na ciągłej, wielokrotnej ekstrakcji zliofilizowanego produktu za pomocą eteru etylowego, odparowaniu rozpuszczalnika organicznego i oznaczeniu masy tłuszczu. Analizę wyników wykonano stosując dane w przeliczeniu na zawartość tłuszczu w świeżej masie. Analizę profilu kwasów tłuszczowych (n=4) wykonano przy zastosowaniu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas firmy Shimadzu (model QP 5050A) wyposażonego w kolumnę kapilarną SP-2560 o długości 100 m, grubości filmu 0,25 µm i średnicy 0,25 mm (Supelco). Gaz nośny stanowił hel. Identyfikację estrów metyloowych wyższych kwasów tłuszczowych dokonano w oparciu o mieszaninę referencyjną tych związków (FAME Mixture, Larodan Fine Chemicals) oraz bibliotekę widm masowych (NIST 1.7).

Dane analizowano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji STATISTICA wersja 10 pakietu (StatSoft, OK.) stosując test Tukey'a przy $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Średni przyrost masy ciała szczurów żywionych dietą LCHP był niższy niż u szczurów żywionych dietą kontrolną i dietą WD. W przypadku diety kontrolnej średni

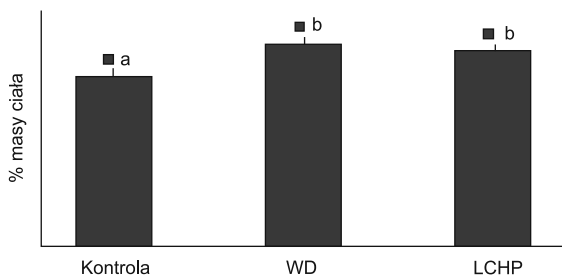
przyrost masy wyniósł 459,3 g, natomiast u szczurów żywionych dietą WD wyniósł 468,2 g, a dietą LCHP 353,8 g (ryc. 1). Największe różnice masy widoczne były od 4 tygodnia stosowania diet.



Ryc. 1. Wpływ diety kontrolnej, WD i LCHP na przyrost masy ciała szczurów. Poziom istotności statystycznej $p < 0,05$

Fig. 1. Influence of control diet, WD and LCHP on body mass increase in rats. P value < 0.05 .

Wyniki innych badań również wskazują, że dieta LCHP może wpływać na redukcję masy ciała (9–12). Spadek masy ciała u zwierząt żywionych dietą LCHP może być związany ze zwiększeniem w diecie udziału metioniny. Kazeina, której zastosowano 52,4% w diecie LCHP dostarczała 1,47% metioniny, czyli około 2,5 razy więcej w porównaniu do diety kontrolnej (0,56%). Wg *Sarwar* i wsp. (10) zwiększenie w diecie udziału metioniny dwukrotnie wobec wymaganej ilości (5 i 10 g/kg) nie miało wpływu na wzrost samców i samic szczurów. Natomiast trzykrotność ilości wymaganej (20 g/kg diety) spowodowała istotną redukcję masy ciała. W diecie LCHP ilość węglowodanów jest istotnie zmniejszona. Takie ograniczenia węglowodanów przyczyniają się do pojawiającego się stanu ketozy. Ponieważ ciała ketonowe są wydalane z moczem, szybka początkowa utrata masy ciała, obserwowana przez wielu autorów, może być wynikiem moczopędnego działania diety (11). *Menegon* i wsp. wykazali, że u szczurów z kwasicą metaboliczną, często obserwowano niższą masę ciała (12).

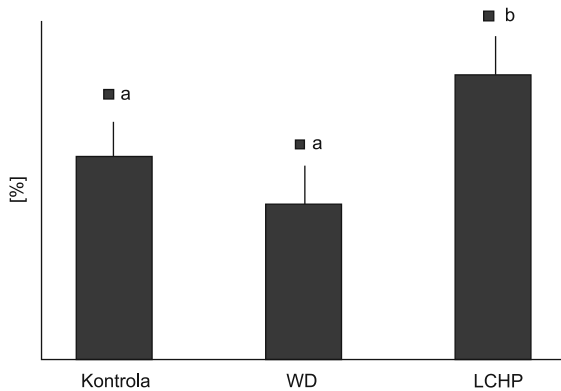


Ryc. 2. Wpływ diety kontrolnej WD i LCHP na masę wątroby (n=6). Poziom istotności statystycznej $p < 0,05$.

Fig. 2. Influence of control diet, WD and LCHP on livers' mass (n=6). P value < 0.05 .

Średnia masa wątrób szczurów żywionych dietami WD (4,1 g/100 g m.c.) i LCHP (4,0 g/100 g m.c.) była statystycznie wyższa, niż w przypadku diety kontrolnej (3,5%) (ryc. 2). Uzyskane wyniki były zbieżne z wynikami innych autorów. W badaniach *Buettner* i wsp. również zaobserwowano, iż szczury żywione dietą wysokotłuszczową miały masę wątroby wyższą od szczurów, które dostawały podstawową dietę. Największy wzrost masy wątroby (35%) odnotowano w grupie, której dieta była oparta na oleju rybnym (13).

Średnia zawartość tłuszczu w wątrobie u szczurów żywionych dietą kontrolną i WD była zbliżona (wyniosła odpowiednio 5,55 g i 4,29 g). Natomiast u zwierząt otrzymujących dietę LCHP zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost zawartości tłuszczu w badanym narządzie (7,81 g) (ryc. 3).



Ryc. 3. Wpływ diety kontrolnej, WD i LCHP na zawartość tłuszczu w wątrobie (n=6). Poziom istotności statystycznej $p < 0,05$.

Fig. 3. Influence of control diet, WD and LCHP on fat content in liver (n=6). P value < 0.05.

Dane przekrojowe wskazują, że zawartość tłuszczu w diecie ma istotny wpływ na wątrobę. W przeprowadzonych badaniach (14, 15), autorzy wskazują, że duża ilość tłuszczu w diecie wpływa na wzrost zawartości tłuszczu w wątrobie nawet o 30%. Inne źródła podają, iż na większą akumulację tłuszczu w wątrobie może wpływać również występowanie insulinooporności (16).

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że diety WD i LCHP zwiększają udział nasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie, przy czym dieta LCHP wykazała silniejszy wpływ. Również wykazano tendencję spadkową wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie szczurów (tab. I). Dane literaturowe potwierdzają uzyskane wyniki (17). Dieta wysokotłuszczowa zwiększa udział nasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie. Wyjaśnienie efektu wysokobiałkowej diety na istotnie statystyczny wzrost SFA wymaga dalszych badań.

Tabela I. Zawartość kwasów tłuszczowych w wątrobie szczurów żywionych dietą WD oraz LCHP

Table I. Content of fatty acids in livers of rats fed with WD and LCHP diet

	AIN	WD	LCHP
C14:0	1,0±0,1a	1,9±0,4b	2,1±0,4b
C14:1	0,1±0,0ns	0,2±0,1ns	0,2±0,0ns
C15:0	0,1±0,0a	0,4±0,0b	0,6±0,0c
C16:0	34,6±5,6ns	32,0±0,6ns	35,6±0,6ns
C16:1	11,7±3,3a	7,2±2,5ab	3,3±0,3b
C17:0	0,2±0,0a	0,4±0,1a	0,8±0,1b
C17:1	0,2±0,0a	0,5±0,0b	0,5±0,0b
C18:0	3,4±1,3a	6,4±1,2b	7,7±0,9b
C18:1	33,6±1,8a	44,2±3,2b	43,7±1,8b
C18:2	12,5±6,8a	3,3±0,8b	3,7±0,2b
C18:3	0,7±0,6ns	0,3±0,1ns	0,6±0,1ns
C20:4	1,9±1,6ns	2,6±0,8ns	0,8±0,2ns
SFA	39,3±4,4a	41,1±1,0a	46,8±1,7b
MUFA	45,6±4,9a	52,2±2,3b	47,7±1,7ab
PUFA	15,1±9,0ns	6,2±1,4ns	5,1±0,3ns

Poziom istotności statystycznej $p < 0,05$; ns – oznacza brak istotności statystycznej.
value $p < 0.05$; ns – not significant

WNIOSKI

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano negatywne skutki diety bogatej w białko w modelu zwierzęcym. Wysokobiałkowe diety o niskiej zawartości węglowodanów nie powinny być zalecane.

R.B. Kostogryś, A. Manterys, M. Franczyk-Żarów, E. Maślak,
A. Florkiewicz, I. Wybrański

EFFECT OF LOW CARBOHYDRATE HIGH PROTEIN DIET (LCHP) ON LIVERS IN WISTAR RATS

Summary

Low carbohydrate high protein diets (LCHP) have become extremely popular all over the world. Recent reports indicate that these diets have a negative effect. The aim of the study was to assess the effect of LCHP diet on liver lipid content as well as fatty acid profile in Wistar rats. The animals (18 two-month old male rats) were divided into 3 experimental groups and were fed for 8 weeks following diets: control (AIN – 93G), high fat diet (WD) and low carbohydrate high protein diet (LCHP). As a source of fat, in the control diet 7% of soybean oil was used, and 21% of butter in WD and LCHP diets was used. The amount of protein in the LCHP diet was twice as compared to the other groups. The animals received diet and water ad libitum.

Animal body weight was monitored once a week. After 8 weeks the livers were collected from animals. The levels of total fat concentration were determined using Soxtec Avanti 2050/LECO TFE 2000. In the experiment, there were statistically significant changes in weight gain of the animals. Total fat content in LCHP group was significant higher compared to the other groups. LCHP diet had a significant influence on liver weight and fat content. Additional, effect of LCHP diet on the fatty acid profile was observed.

PIŚMIENNICTWO

1. *Loomba R, Sanyal AJ*: The global NAFLD epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013; 10: 686-690.
2. *Abenavoli L, Di Renzo L, De Lorenzo A*: Body Composition and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Lifestyle Med.*, 2016; 6(1): 47-48.
3. *Mensink RP, Zock PL, Kester ADM*: Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77(5): 1146-1155.
4. *Sacks FM, Katan M*: Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am. J. Med.*, 2002; 30(113): 13S-24S.
5. *Floegel A, Pischon T*: Low carbohydrate-high protein diets. *BMJ*, 2012; 344: 801.
6. *Foo S Y, Heller E R., Wykrzykowska JI.*: Vascular effects of a low-carbohydrate high-protein diet. *PNAS*, 2009; 8(36): 15418-15423.
7. *Kostogrys RB, Franczyk-Żarów M, Maślak E, Gajda M, Mateuszuk L, Jackson CL, Chłopicki S.*: Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR^{-/-}). *Atherosclerosis*, 2012; 223(2): 327-331.
8. *Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC*: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 1993; 123: 1939-1951.
9. *Allen R, Stephen A*: Low-Carbohydrate Diets. *Am. Fam. Physician.*, 2006; 73(11), 1942-1948.
10. *Sarwar G, Peace RW, Botting HG, L'Abbé, MR, Keagy PM*: Influence of dietary methionine with or without adequate dietary vitamins on hyperhomocysteinemia in rats. *Nutr. Res.*, 2000; 20(12): 1817-1827.
11. *Parikh P, McDaniel MC, Ashen MD, Miller JJ, Sorrentino M, Chan V, Blumenthal RS, Sperling LS*: Diets and Cardiovascular Disease An Evidence-Based Assessment. *J. Am. Col. Cardiol.*, 2005; 45(9): 1379-1387.
12. *Menegon LF, Figueiredo JF, Gontijo JA*: Effect of metabolic acidosis on renal tubular sodium handling in rats as determined by lithium clearance. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1998; 31: 1269-1273.
13. *Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC*: Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Molecul. Endocrinology*, 2006; 36: 486-501.
14. *Mollard RC, Sénéchal M, MacIntosh AC, Hay J, Wicklow BA, Wittmeier KD, Sellers EA, Dean HJ, Ryner L, Berard L, McGavock JM*: Dietary determinants of hepatic steatosis and visceral adiposity in overweight and obese youth at risk of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2014; 99(4): 804-812.
15. *Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Järvinen H*: Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(5), 2804-2809.
16. *Tiikkainen M, Tamminen M, Häkkinen AM, Bergholm R, Vehkavaara S, Halavaara J, Teramo K, Rissanen A, Yki-Järvinen H*: Liver-fat accumulation and insulin resistance in obese women with previous gestational diabetes. *Obesity Res.* 2002; 10(9): 859-867.
17. *Qamar A, Usmani A, Waqar H, Siddiqui A, Kumar H*: Ameliorating effect of *Allium Sativum* on high-fat diet induced fatty liver in albino rats. *Pak. J. Med. Sci.* 2016; 32(2), 403-407.

Adres: ul. Kopernika 15A, 31-501 Kraków