

Edyta Maślak, Renata B. Kostogrys, Paweł M. Pisulewski

WPŁYW SPRZĘŻONYCH DIENÓW KWASU LINOLOWEGO (CLA) NA MASĘ I ZMIANY HISTOLOGICZNE WĄTROBY ORAZ POZIOM TRIACYLOGLICEROLI U SZCZURÓW ŻYWIONYCH DIETĄ WYSOKOFUKTOZOWĄ

Katedra Żywienia Człowieka Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. inż. P. M. Pisulewski

Celem pracy było określenie wpływu sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) na poziom triacylogliceroli w surowicy, masę ciała, masę wątroby oraz jej stłuszczenie u szczurów rasy Wistar. Stwierdzono, że dodatek do diety fruktozy istotnie statystycznie zwiększa masę wątroby, wywołuje jej stłuszczenie oraz podnosi stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów. Wykazano również, że CLA skutecznie przeciwdziała stłuszczeniu wątroby nie mając wpływu na pozostałe badane parametry.

Hasła kluczowe: CLA, fruktoza, stłuszczenie wątroby, hipertriglicydemia, szczury.
Key words: CLA, fructose, liver steatosis, hypertriglyceridemia, rats.

Fruktoza, inaczej cukier owocowy (łac. *fructus* – owoc), jest monosacharydem występującym głównie w owocach i miodzie. Wchodzi także w skład dwucukru sacharozy (glukoza + fruktoza). Fruktoza charakteryzuje się o około 40% większą siłą słodzącą niż sacharoza. Ma również niższy indeks glikemiczny (22 vs 65) (1). Z tego względu cukier ten zalecany był diabetykom jako naturalny, korzystnie oddziałujący na organizm zamiennik sacharozy. Stosunkowo niska cena produkcji oraz jej właściwości technologiczne pozwalają na szerokie zastosowanie fruktozy w przemyśle spożywczym m. in. do słodzenia napojów, soków owocowych, lodów i mrożonych deserów, a także dżemów i galaretek. Obecnie szacuje się, że aż 2/3 spożywanej fruktozy pochodzi z żywności, do której została ona dodana podczas produkcji, a tylko 1/3 z naturalnych źródeł. Wykazano, że spożycie tego cukru od 1970 roku wzrosło 80-krotnie (2). Najnowsze badania z udziałem ludzi i zwierząt doświadczalnych przestrzegają, że zwiększone spożycie fruktozy, skutkuje obniżeniem wrażliwości organizmu na insulinę, hipertriglicydemią oraz stłuszczeniem wątroby (3, 4).

Sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) obejmują grupę izomerów pozycyjnych i geometrycznych kwasu linolowego (C 18:2), należącego do niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-6. Głównym źródłem CLA jest tłuszcz mleka i mięsa zwierząt poligastycznych, a dominującymi izomerami *cis*-9, *trans*-11 oraz *trans*-10, *cis*-12 (5). Badania dowodzą, że CLA działa przeciwnowotworowo i przeciwmiażdżycowo. Ponadto wykazuje on działanie odchudzające i korzystne właściwości w leczeniu cukrzycy typu 2 (6). Ostatnio stwierdzono również, że CLA przeciwdziała niealkoholowemu stłuszczeniu wątroby (7).

Celem doświadczenia była ocena wpływu mieszaniny sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) na masę ciała, stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi oraz masę i zmiany histologiczne wątroby u szczurów otrzymujących dietę wysokofruktozową.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniu wykorzystano 36 szczurów, samców rasy Wistar, o początkowej średniej masie ciała ok. 100 g. Doświadczenie przeprowadzono po pozytywnym zaopiniowaniu badań przez Lokalną Komisję Etyczną nr I w Krakowie. Zwierzęta podzielono na 4 grupy (po 9 szczurów w każdej) i umieszczono w klatkach z trocinami. Zwierzęta przez cały okres doświadczenia miały nieograniczony dostęp do diety i wody. Doświadczenie prowadzono w pomieszczeniu o temperaturze 22–25°C, w którym zachowywano 12-godzinny cykl światła i ciemności. Zwierzęta żywiono przez 3 miesiące standardową dietą AIN-93G (K) wg Reeves (8) oraz jej modyfikacjami: dietą wysokofruktozową (F), dietą wzbogaconą w CLA (K + CLA) oraz dietą wysokofruktozową z dodatkiem CLA (F + CLA). Skład diet doświadczalnych przedstawiono w tabeli I. Dietę wysokofruktozową przygotowano kosztem sacharozy i skrobi kukurydzianej, natomiast diety wzbogacone preparatem CLA kosztem oleju sojowego (tab. I).

Po upływie czasu żywienia, zwierzęta zważono i uśpiono metodą dootrzewnej iniekcji (Thiopental; 25 mg/100 g m.c.). Od szczurów pobrano krew z serca

Tabela I. Skład diet eksperymentalnych

Table I. Composition of experimental diets

Składniki	K	F	K + CLA	F + CLA
	AIN-93G	AIN-93G + 60% Fruktozy	AIN-93G + 1% CLA	AIN-93G + 60% Fruktozy + 1% CLA
	g/kg			
Skrobia kukurydziana	532,486	–	532,486	–
Kazeina	200	200	200	200
Sacharoza	100	–	100	–
Olej sojowy	70	70	53,33	53,33
Błonnik pokarmowy	50	50	50	50
Mieszanka mineralna	35	35	35	35
Mieszanka witaminowa	10	10	10	10
Cholina	2,5	2,5	2,5	2,5
Tert- butylohydrochinon	0,014	0,014	0,014	0,014
Fruktoza	–	632,486	–	632,486
CLA	–	–	16,67	16,67

i wycięto wątroby. We krwi oznaczono stężenie triacylogliceroli wykorzystując aparat Cobas Integraf 400/800 firmy Roche. Wątroby zważono na wadze technicznej i wykonano preparaty histologiczne, które wybarwiono hematoksyliną i eozyną (9).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując dwuczynnikową analizę wariancji; istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi określono testem *Duncana* wykorzystując program komputerowy STATISTICA 8.0.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Przeprowadzone doświadczenie nie wykazało zmian w masie ciała zwierząt na skutek podaży diety wysokofruktozowej. Również dodatek do diety CLA nie miał wpływu na masę ciała (tab. II).

Podobne obserwacje poczynili *Ackerman* i współpr. (10). Nie odnotowali oni różnic w masie ciała po 5 tygodniach żywienia szczurów dietą wzbogaconą w 60% fruktozy. Również *Le* i współpr. (11) wykazali w swych badaniach, że dieta wysokofruktozowa wywołuje u ludzi hipertriglicydemię bez wpływu na masę ciała. Wyniki te są odmienne od uzyskanych przez *Benado* i współpr. (12), którzy badali wpływ różnych dawek fruktozy na organizm szczurów. Wykazali oni, że dawki 10% i 20% fruktozy w diecie nie mają wpływu na masę ciała zwierząt, natomiast poziom 45% skutkował jej obniżeniem. Autorzy tłumaczą ten fakt mniejszym spożyciem diety przez tą grupę szczurów.

Tab e l a II. Wpływ rodzaju diety na masę ciała, masę wątroby oraz stężenie triacylogliceroli u szczurów ($X \pm SD$, $n=9$)

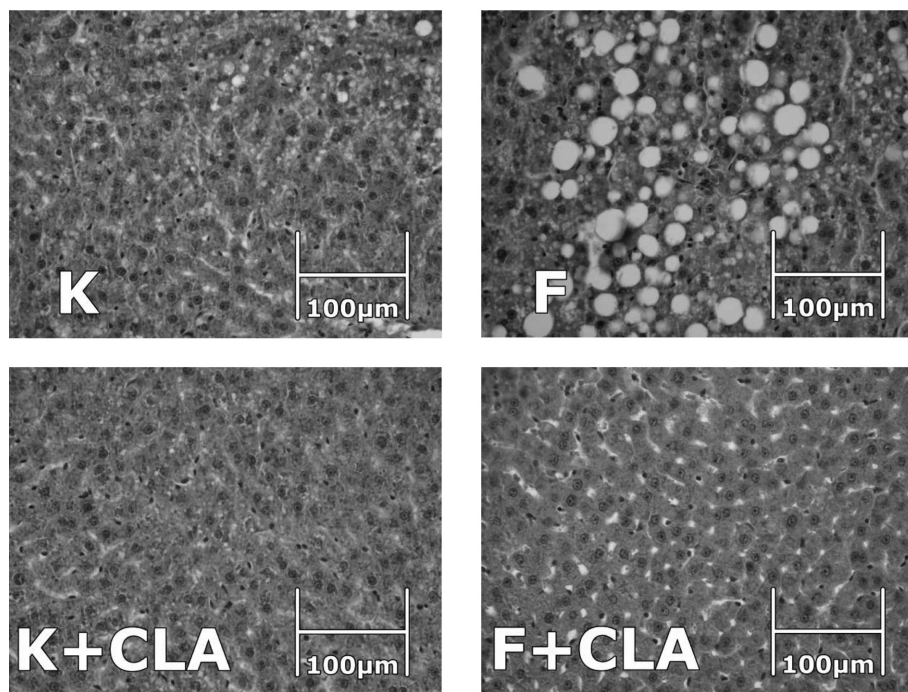
Table II. Effects of different types of diets on body weight, liver weight and triglycerides concentration in rats ($X \pm SD$, $n=9$)

Dieta \ Parametr	K	F	K + CLA	F + CLA
Masa ciała (g)	559,33±72,72	526,33±31,2	565,66±91,6	527,44±46,6
Masa wątroby (g)	2,87±0,6 ^a	3,42±0,3 ^b	2,82±0,2 ^a	3,29±0,2 ^b
TG (mmol/l)	1,68±1,07 ^a	3,07±1,57 ^b	1,9±0,98 ^a	2,44±1,56 ^{ab}

a, b – różnica istotna statystycznie $p \leq 0,05$

a, b – significant difference $p \leq 0,05$

Wykazano, że trzymiesięczny okres żywienia zwierząt dietą wysokofruktozową istotnie podwyższył poziom triacylogliceroli, stymulował przyrost masy wątroby (tab. II) oraz wywołał stłuszczenie wątroby u szczurów (ryc. 1). Obserwacje te są zgodne z doniesieniami innych autorów (3, 13). Literatura podaje, że odkładanie się tłuszczu w wątrobie skutkuje wzrostem masy tego narządu. Wysoki poziom triacylogliceroli również sugeruje wystąpienie zmian wątrobowych. Jedną z przyczyn stłuszczenia wątroby jest bowiem zwiększona, na skutek metabolizmu fruktozy, lipogeneza. Powoduje to wzrost poziomu triacylogliceroli, których wątroba nie nadążając metabolizować magazynuje oraz uwalnia do krwi (14).



Ryc. 1. Histologia wątroby ($X \pm SD$, $n=9$).

Fig. 1. Liver histology ($X \pm SD$, $n=9$).

Brak stłuszczenia wątroby został natomiast odnotowany w grupach żywionych dietą wzbogaconą w CLA (ryc. 2). Odnotowany w tym przypadku brak wpływu CLA na masę wątroby należy więc tłumaczyć wystąpieniem interakcji między fruktozą a CLA. Dane literaturowe potwierdzają protekcyjny wpływ CLA na wątrobę (15). Badania nie wykazały również istotnego wpływu CLA na poziom triacylogliceroli, odnotowano natomiast tendencję biologiczną w tym kierunku (tab. II). Prawdopodobnie można to tłumaczyć zbyt małą dawką CLA zastosowaną w diecie zwierząt. Brak jednak danych literaturowych na temat właściwości CLA w przypadku żywienia zwierząt dietą wysokofruktozową, stąd niezbędne jest prowadzenie dalszych badań w tym zakresie.

WNIOSKI

1. Dieta wysokofruktozowa wywołuje u szczurów hipertriglicydemie, stłuszczenie wątroby oraz stymuluje przyrost masy tego narządu, nie mając wpływu na masę ciała zwierząt.

2. CLA nie ma wpływu na masę ciała, masę wątroby oraz poziom triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów. Wykazuje natomiast prozdrowotne działanie w przypadku stłuszczenia wątroby.

3. Dodatek CLA do diety wysokofruktozowej skutkuje brakiem chorobowych zmian w wątrobie (brak stłuszczenia) nie mając wpływu na masę tego narządu, masę ciała oraz poziom triacylgliceroli u szczurów.

E. Maślak, R.B. Kostogryś, P.M. Pisulewski

EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) SUPPLEMENTATION
ON LIVER WEIGHT, LIVER STEATOSIS AND TRIACYLGLYCEROL CONCENTRATION
IN HIGH-FRUCTOSE FED RATS

Summary

The aim of this study was evaluate the effect of conjugated linoleic acid (CLA) on body weight, liver weight, liver steatosis and triglycerides concentration in rats fed high fructose diet. The body weight in experimental rats was unchanged. It was found that high-fructose diet (60%) significantly increased triacylglycerol concentration and liver weight in rats. Additionally fructose in diet induced rats liver steatosis. The diet supplement with 1% of CLA prevent hepatic lipid accumulation without effects on the other investigated parameters.

PIŚMIENNICTWO

1. Ciok J., Talikowski T., Wýrobek I.: Fruktaza jako czynnik ryzyka przewlekłych chorób metabolicznych. *Żywnie Człowieka i Metabolizm*, 2004; XXXI, nr 1, 88-96. – 2. Gaby A.R.: Adverse effects of dietary fructose. *Altern Med Rev*, 2005 Dec; 10(4): 294-306. – 3. Armutcu F., Kanter M., Gurela A. i wspópr.: Excessive Dietary Fructose is Responsible for Lipid Peroxidation and Steatosis in the Rat Liver Tissues. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 2007, 27: 164-169. – 4. Lee O., Bruce W.R., Dong Q.: Fructose and carbonyl metabolites as endogenous toxins. *Chem Biol Interact*, 2009; 178 (1-3): 332-339. – 5. Stangl G.I.: Conjugated Linoleic Acids Exhibit a Strong Fat-to-Lean Partitioning Effect, Reduce Serum VLDL Lipids and Redistribute Tissue Lipids in Food-Restricted Rats. *J. Nutr*, 2000; 130: 1140-1146. – 6. Bhattacharya A., Banu J., Rahman M.: Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem*, 2006 Dec; 17(12): 789-810. – 7. Purushotham A., Shrode G., Wendel A. i wspópr.: Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. *J Nutr Biochem*, 2007; 18 (10): 676-684. – 8. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C.: 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 Nov; 123(11): 1939-51. – 9. Litwin J.A.: Podstawy technik mikroskopowych. Wyd. UJ. Kraków 1999 r. – 10. Ackerman Z., Oron-Herman M., Grozovski M. i wspópr.: Fructose-Induced Fatty Liver Disease. Hepatic Effects of Blood Pressure and Plasma Triglyceride Reduction. *Hypertension*, 2005; 45, 1012-1018.

11. Lê K.A., Faeh D., Stettler R. i wspópr.: A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*, 2006 Dec; 84(6): 1374-9. – 12. Benaudo M., Alcantara C., De la Rosa R. i wspópr.: Effects of various levels of dietary fructose on blood lipids of rats. *Nutr Res*, 2004; 24, 565-571. – 13. Koo H.-Y., Wallig M.A., Chung B.H.: Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1782 (5): 341-348. – 14. Basciano H., Federico L., Adeli K.: Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*, 2005, 2:5. – 15. Nagao K., Inoue N., Wang Y.: Dietary Conjugated Linoleic Acid Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Zucker (fa/fa) Rats. *J. Nutr*, 2005; 135: 9-13.

Adres: 30-149 Kraków, ul. Balicka 122.