

Mechanizmus hypocholesterolemického efektu hľivy ustricovitej (*Pleurotus ostreatus*) u potkana s hypercholesterolémiou

PAVEL BOBEK - LUBOMÍR OZDÍN - ĽUDOVÍT KUNIAK - MELITA HRMADOVÁ

SÚHRN. V sérii pokusov na samcoch potkanov (Wistar) sa zistilo, že prídavok 5 % sušenej hľivy ustricovitej do cholesterolovej (0,3 %) diéty po 8-10 týždňoch výrazne znížil vstrebávanie cholesterolu a jeho biosyntézu v pečeni. Výrazne poklesla produkcia cholesterolom obohatených lipoproteínov veľmi nízkej hustoty. Urýchlil sa katabolizmus lipoproteínov všetkých tried, celkového plazmatického cholesterolu a produkcia a fekálna exkrécia neutrálnych sterolov i žľových kyselín. Hľiva ovplyvnením vstrebávania, biosyntézy a katabolizmu cholesterolu spomaľovala cholesterolovou diétou indukovanú akumuláciu cholesterolu v plazme a pečeni.

Na základe súčasných poznatkov sa všeobecne akceptuje, že korigovanie zvýšených hladín sérového cholesterolu hrá významnú úlohu v prevencii aterosklerózy [1]. Z pohľadu kľúčového významu oxidačného stresu v patogenéze aterosklerózy predstavuje zvýšená hladina cholesterolu lipoproteínov nízkej hustoty (LDL) zvýšenú ponuku substrátu pre lipoperoxidáciu. Oxidačne zmenené častice LDL sú prednostne akceptované skavengerovými receptormi makrofágov za vzniku penových buniek, čo zvyšuje riziko ateromatóznej prestavby cievnej steny [2]. V krajinách s trvale nepriaznivým vývojom hypercholesterolémií a kardiovaskulárnych ochorení má mimoriadny význam vyhľadávanie a štúdium prírodných látok s hypocholesterolemickou a antioxidačnou aktivitou. Z hľadiska dietetickej prevencie rozvoja a liečby hypercholesterolémií sú vyššie huby takmer ideálnym prostriedkom pre vysoký obsah diétnej vlákniny, rastlinných sterolov, proteínov a mikroelementov a pre nízky obsah energie. Orientálna medicína ako prvá poukázala na možnosť využitia húb v prevencii a terapii hyperlipémií. V Čínskej ľudovej republike používajú huby ako súčasť hypolipidemickej diéty postavenej na báze prírod-

RNDr. Pavel Bobek, CSc., Lubomír Ozdín, Výskumný ústav výživy, Limbová 14, 833 37 Bratislava.

Ing. Ľudovít Kuniak, CSc., Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

MUDr. Melita Hromadová, CSc., Ústav experimentálnej endokrinológie, Slovenská akadémia vied, Vlárská 3, 833 06 Bratislava.

ných látok s protisklerotickým účinkom [3]. V sérii experimentov sme zistili, že dlhodobá konzumácia diéty s prídavkom 5 % sušených plodníc hľivy ustricovitej (*Pleurotus ostreatus*, drevokazná huba pestovaná u nás i v rade iných krajín priemyselne) efektívne bráni akumulácii cholesterolu v krvi i pečeni pokusných zvierat, ktorá bola indukovaná buď alimentárne (zvýšený príjem cholesterolu [4]), stimuláciou endogénnej produkcie lipidov (chronický príjem etanolu, streptozotocínový diabetes [5,6]), alebo geneticky (hereditárne zvýšená vnímavosť k diétnemu cholesterolu [7]). V uvedených experimentoch rozhodujúcu úlohu v poklese hladiny sérového cholesterolu hral pokles hladiny cholesterolom obohatených lipoproteínov veľmi nízkej hustoty (VLDL) a ich katabolitov - LDL, pričom hladina lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL) sa zvyšovala. Uvedené poznatky nasvedčovali tomu, že hľiva zasahuje do metabolizmu lipoproteínov všetkých tried a tým aj do regulácie homeostázy cholesterolu. V predloženej práci sme zhrnuli výsledky viacerých pokusov, zameraných na vysvetlenie mechanizmu uvedeného javu a overenie teoreticky predpokladanej antilipoperoxidačnej aktivity hľivy ustricovitej.

Materiál a metódy

Pokusy boli uniformne uskutočnené so samcami potkanov kmeňa Wistar (o počiatočnej hmotnosti okolo 60-75 g), kŕmených 8-10 týždňov semisyntheticou diétou nasledovného zloženia [8] ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$): škrob 60, kazeín 18, bravčová masť 10, celulóza 6, minerálna a vitamínová zmes 4 a 1, Fel tauri 0,55, cholesterol 0,3 a cholíchlorid 0,15. Pokusné zvieratá mali v tejto diéte na úkor celulózy 5 % sušených mletých plodníc hľivy ustricovitej (*Pleurotus ostreatus*). Mletá huba obsahovala ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$): polysacharidy 65-70 (z toho 20-25 g vo vode rozpustný, gélotvorný, nízkopolymerovaný β -1,3-D-glukan), proteíny 20-25, lipidy 2,2, popol 4,8 a voda do 5. Jednotlivé pokusy boli rôzne zakončené podľa toho, na ktorý úsek metabolizmu cholesterolu boli zamerané. Vo všetkých prípadoch boli zvieratá usmrčované dekapitáciou po 18 h odstavení od potravy.

Pravidelne sme stanovili obsah cholesterolu v sére (Oxochrom Chol 250E), v chloroform-metanolovom (2:1) extrakte pečene (Bio-La-Test) a v lipoproteínoch [9], izolovaných sekvenčnou flotáciou [10] pri $d < 1,006$, $d < 1,063$ a $d < 1,21 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (VLDL, LDL, HDL).

Produkcia a sekrécia VLDL bola stanovená z nameraných hodnôt rádioaktivity v pečeni a VLDL, izolovaných zo séra 2 h po simultánnom podaní Tritonu WR 1339 (i.v., blokuje lipoproteínovú lipázu, t.j. periférnu lipolýzu VLDL [11]) a $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{-acetátu}$ (i.p.) [12].

Frakčnú katabolickú rýchlosť (FCR) sme určili z regresnej analýzy metódou najmenších štvorcov závislosti dpm-čas [13] po i.v. podaní VLDL, LDL a HDL označených ^{125}I [13].

Absorpciu cholesterolu sme stanovili metódou dvojite značeného cholesterolu (žalúdočnou sondou sa podal [1,2-³H(N)]-cholesterol a i.v. [4-¹⁴C]-cholesterol [15]. Z hodnôt rádioaktivity v krvi nameraných v priebehu týždňa je možné určiť regresnou analýzou FCR plazmatického cholesterolu.

Biosyntézu lipidov v pečeni sme určili z rozsahu inkorporácie i.v. aplikovaného [1-¹⁴C]-acetátu do lipidov [12].

Aktivitu HMG-CoA reduktázy (3-hydroxy-3-metylglutaryl CoA reduktáza) sme stanovili kvantifikovaním produkcie ¹⁴C-mevalonátu pri inkubácii pečenných mikrozómov s HMG-CoA[3-¹⁴C] [16].

Katabolizmus cholesterolu sme určili kvantifikovaním fekálnej exkrécie neutrálnych sterolov a žľových kyselín zo 4-dňovej bilančnej štúdie [17].

Aktivita 7- α -hydroxylázy bola vyjadrená rýchlosťou premeny [4-¹⁴C]-cholesterolu na 7- α -hydroxyderivát pri 30 min inkubácii za prítomnosti pečenných mikrozómov a NADPH [18].

Konjugované diény sme stanovili v erytrocytoch a pečeni [19] ako absorbanciu pri 233 nm heptanového extraktu po extrakcii materiálu zmesou heptan-izopropanol (1:1) [19]. Hydroperoxidy sme stanovili spektrofotometrickým kvantifikovaním oxidácie jodidu draselného vzorkou plazmy alebo chloroform-metanolového (2:1) extraktu pečene [20].

Vnímateľnosť pečenného tkaniva k oxidácii sme určili z produkcie peroxidov lipidov (boli stanovené ako produkty reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou, TBARS) pri 1 h inkubácii v prostredí generujúcim voľné radikály (Fe^{2+} + kyselina askorbová) [21].

Aktivity superoxidizmutázy, katalázy a glutatiónpoxidázy sme stanovili v pečeni (komerčným setom, respektíve podľa [22] a [23]).

Výsledky sme štatisticky hodnotili Studentovým t-testom.

Výsledky a diskusia

Distribúcia cholesterolu v lipoproteínoch

Podobne ako vo všetkých ďalších pokusoch hliva v diéte neovplyvnila v porovnaní s kontrolnou diétou finálne hmotnosti zvierat ani pečene. Po 8 týždňoch vysokocholesterolová diéta u potkanov výrazne zvýšila hladinu cholesterolu v sére i pečeni. Došlo k výraznej redistribúcii cholesterolu v lipoproteínoch: zvýšil sa obsah cholesterolu vo VLDL a ich katabolických produktoch LDL, pričom výrazne poklesol obsah cholesterolu v HDL, ktoré za fyziologických podmienok nesú 60-70 % sérového cholesterolu). U zvierat

na diéte s hľivou (pri vysoko- i nízkocholesterolovej diéte) klesol obsah cholesterolu v sére i pečeni o 30 resp. viac ako 50 %. Na oboch diétach konzumácia hľivy znížila obsah cholesterolu vo VLDL i LDL na menej ako polovicu, pričom pri nízkocholesterolovej diéte podiel cholesterolu viazaného v HDL dosiahol fyziologickú úroveň (tab. 1.). Zistené zmeny v distribúcii cholesterolu v lipoproteínoch nasvedčujú, že konzumácia hľivy znižuje produkciu, alebo urýchľuje klérens „rizikových“, cholesterolom obohatených VLDL a LDL a stimuluje tzv. spätný transport cholesterolu, t.j. od periférnych tkanív k odbúraniu v pečeni, sprostredkovaný HDL.

TABULKA 1. Obsah cholesterolu v sére, pečeni a lipoproteínoch potkana.
TABLE 1. Cholesterol content in serum, liver and in lipoproteins of rats.

	DIÉTA ¹			
	vysokocholesterolová ²		nízkocholesterolová ³	
	kontrolná ⁴	s hľivou ⁵	kontrolná	s hľivou
Telesná hmotnosť ⁶ [g]	301 ± 8	296 ± 10	302 ± 11	295 ± 12
	[mmol.kg ⁻¹]			
Pečeň ⁷	241 ± 12	116 ± 11 ^e	30 ± 3	11 ± 1 ^e
	[mmo.l ⁻¹]			
Sérum ⁸	5,12 ± 0,55	3,44 ± 0,16 ^b	3,00 ± 0,20	2,20 ± 0,09 ^d
VLDL ⁹	2,56 ± 0,32	1,34 ± 0,27 ^b	0,94 ± 0,18	0,26 ± 0,03 ^c
	[%] ⁺ 48,1 ± 1,3	39,0 ± 3,0 ^a	33,7 ± 3,1	12,9 ± 0,9 ^e
LDL ¹⁰	2,12 ± 0,35	1,03 ± 0,12 ^b	0,58 ± 0,11	0,36 ± 0,03
	[%] ⁺ 39,4 ± 2,3	32,4 ± 2,4	20,8 ± 2,0	17,3 ± 1,2
HDL ¹¹	0,64 ± 0,08	0,86 ± 0,04 ^a	1,26 ± 0,04	1,55 ± 0,08 ^b
	[%] ⁺ 12,5 ± 1,6	28,6 ± 3,6 ^c	45,5 ± 3,9	69,8 ± 1,8 ^e

Hodnoty sú priemery ± SEM (štandardná odchýlka aritmetického priemeru) z 10 zvierat v oboch skupinách.

a, b, c, d, e - štatistická preukaznosť (s hľivou vs kontrolná diéta): a - p < 0,05, b - p < 0,02, c - p < 0,01, d - p < 0,002, e - p < 0,001.

+ - podiel z celkového sérového cholesterolu. Vysokocholesterolová diéta obsahovala 0,3 % cholesterolu, nízkocholesterolová 0,009 %.

Values are means ± SEM (standard error of the mean) for 10 animals per group.

a, b, c, d, e - statistical significance (with mushroom vs. control group): a - p < 0.05, b - p < 0.02, c - p < 0.01, d - p < 0.002, e - p < 0.001.

+ - contribution to total serum cholesterol. Content of cholesterol in high and low cholesterol diet was 0.3 and 0.009 % respectively.

1 - diet, 2 - high cholesterol, 3 - low cholesterol, 4 - control, 5 - with oyster mushroom, 6 - body weight, 7 - liver, 8 - serum, 9 - very-low-density lipoproteins, 10 - low-density lipoproteins, 11 - high-density lipoproteins.

TABUĽKA 2. Biosyntéza štruktúrnych lipidov VLDL a ich inkorporácia do nascentných VLDL.
TABLE 2. Biosynthesis of structural lipids of VLDL
in liver and their incorporation into nascent secreted VLDL of rats.

	DIÉTA ¹	
	kontrolná ²	s hľivou ³
Inkorporácia rádioaktívne značeného acetátu do pečevých lipidov ⁴	[10 ³ .dpm.g ⁻¹ pečene] ¹⁰	
celkové lipidy ⁵	58,2 ± 4,1	44,1 ± 2,6 ^e
fosfolipidy ⁶	30,8 ± 2,3	24,5 ± 1,5 ^a
cholesterol ⁷	3,5 ± 0,35	2,1 ± 0,21 ^e
triacylglyceroly ⁸	12,9 ± 0,9	9,9 ± 0,7 ^b
Inkorporácia označených lipidov do VLDL ⁹	[dpm.ml ⁻¹ séra] ¹¹	
celkové lipidy	15243 ± 1065	10038 ± 627 ^e
fosfolipidy	816 ± 86	554 ± 74 ^a
cholesterol	1476 ± 184	816 ± 95 ^c
triacylglyceroly	11966 ± 986	8321 ± 654 ^c

Hodnoty sú priemery ± SEM z 10 zvierat v oboch skupinách. Štatistická preukaznosť pozri tab. 1.

Values are means ± SEM for 10 animals per group. Statistical significance - see Table 1.

1 - diet, 2 - control, 3 - with oyster mushroom, 4 - radioacetate incorporation into liver lipids, 5 - total lipids, 6 - phospholipids, 7 - cholesterol, 8 - triacylglycerols, 9 - radiolabelled lipids incorporation into VLDL, 10 - dpm.10⁻³g⁻¹ of liver, 11 - dpm.ml⁻¹ of serum.

Produkcia a sekrécia VLDL

Pri blokáde periférnej lipolýzy Tritonom WR 1339 sa *de novo* syntetizované lipidové komponenty VLDL hromadia v plazme a z merania inkorporácie rádioaktívne značeného acetátu do týchto lipidov v pečeni a vo VLDL je možné posúdiť ich produkciu a sekréciu. Z výsledkov v tabuľke 2. je zrejmé, že hľiva v diéte spomaľuje biosyntézu všetkých štruktúrnych lipidov VLDL i inkorporáciu *de novo* syntetizovaných lipidov do nascentných VLDL. Sekrečná rýchlosť triacylglycerolov do plazmatického poolu bola pod vplyvom hľivy takmer o 30 % spomalená (135±7 vs. 98±5 μmol.kg⁻¹.h⁻¹). Zistilo sa, že *de novo* syntetizované lipidy sú preferovaným zdrojom pri výstavbe VLDL [24], z čoho vyplýva, že obmedzenie ich biosyntézy a inkorporácie do lipoproteínu sú významnou súčasťou mechanizmu ovplyvnenia koncentrácie VLDL-cholesterolu v sére pod vplyvom hľivy. Zistilo sa, že u potkana cholesterol v diéte stimuluje hepatálnu sekréciu všetkých VLDL-lipidov a apo B, pričom zmeny veľkosti pečevého poolu cholesterolu určujú rýchlosť sekrécie VLDL

[25]. Nakoľko proces hepatálnej sekrécie VLDL je procesom závislým od dodávky substrátu [24], je zrejme, že zníženie obsahu cholesterolu v pečeni pod vplyvom hľivy o viac ako 50 % vytvára podmienky pre zníženú produkciu a sekréciu VLDL. V tejto súvislosti sme v neskorších pokusoch sledovali vplyv hľivy na vstrebávanie, biosyntézu a katabolizmus cholesterolu.

Kinetické parametre plazmatických VLDL, LDL a HDL

Z výsledkov v tabulke 3. je zrejme, že hľiva v diéte urýchľuje frakčnú katabolickú rýchlosť všetkých lipoproteínov transportujúcich cholesterol. Je možné predpokladať, že pri tak výraznom poklese intracelulárneho obsahu cholesterolu v pečeni dochádza k istému uvoľneniu blokády apo B/E receptorov (indukovanej cholesterolovou diétou [26]). To môže mať za následok zvýšenie kapacity receptormi sprostredkovaného katabolizmu LDL a VLDL-remnantov, čiže urýchlenie celej metabolickej kaskády VLDL → LDL. Nascentné HDL produkuje pečeň a tenké črevo ako diskovité častice s vysokou afinitou k voľnému cholesterolu. Umožňujú spätný transport cholesterolu od periférnych tkanív do pečene. Dokázalo sa, že HDL slúžia v pečeni ako akceptor cholesterolu pri jeho prenose z endoteliálnych buniek do parenchymálnych buniek. Tým sa zaisťuje exkrécia cholesterolu do žlče i jeho de-

TABULKA 3. Kinetické parametre lipoproteínov u potkana.
TABLE 3. Kinetics parameters of lipoproteins in rats.

		DIÉTA ¹	
		kontrolná ²	s hľivou ³
VLDL ⁴			
t _{1/2}	[min]	10,5 ± 0,8	7,2 ± 0,6 ^c
FCR ⁵	[min ⁻¹]	0,0661 ± 0,0064	0,0964 ± 0,0075 ^c
LDL ⁶			
t _{1/2}	[h]	6,5 ± 0,4	5,0 ± 0,3 ^b
FCR	[h ⁻¹]	0,1091 ± 0,0075	0,1399 ± 0,0086 ^b
HDL ⁷			
t _{1/2}	[h]	6,3 ± 0,2	4,8 ± 0,3 ^d
FCR	[h ⁻¹]	0,1108 ± 0,0030	0,1452 ± 0,078 ^c

Hodnoty sú priemery ± SEM z 12 zvierat v oboch skupinách. Štatistická preukaznosť pozri tab. 1.

Values are means ± SEM for 12 animals per group. Statistical significance - see Table 1.

1 - diet, 2 - control, 3 - with oyster mushroom, 4 - very-low-density lipoproteins, 5 - fractional catabolic rate, 6 - low-density lipoproteins, 7 - high-density lipoproteins.

gradácia na žľčové kyseliny [27]. Urýchlenie frakčného obratu cholesterolu nepochybne urýchľuje katabolizmus cholesterolu a v konečnom dôsledku vedie k poklesu hladín cholesterolu v krvi.

Vstrebávanie a biosyntéza cholesterolu

V súvislosti so zisteným poklesom produkcie VLDL, závislej od dostupnosti substrátov, bolo možné oprávnenne predpokladať, že hľiva v diéte ovplyvnila vstrebávanie a/alebo biosyntézu cholesterolu. Z výsledkov v tabuľke 4. vyplýva, že hľiva znížila vstrebávanie cholesterolu signifikantne o 14 %. Aktivita kľúčového enzýmu biosyntézy cholesterolu - HMG-CoA reduktázy v pečňových mikrozómoch bola pri nízko- i vysokocholesterolovej diéte pod vplyvom hľivy znížená o 30-40 %. Pokles biosyntézy cholesterolu (a ďalších lipidov) pod vplyvom hľivy bol dokázaný aj poklesom inkorporácie rádioaktívne značeného acetátu do pečňových lipidov (tab. 2.). Hľiva obsahuje väčší počet látok, schopných (usudzujúc z efektu týchto látok z iných prírodných zdrojov) interakciou so žľčovými kyselinami inhibovať tvorbu micel, potrebných pre absorpciu cholesterolu i ďalších lipidov [28]. Ide najmä o vo vode rozpustné gélotvorné komponenty vlákninového komplexu hľivy (nízkopolymerovaný β -1,3-D-glukán, 15-20 %, lignín a pektín 2 a 6 %

TABUĽKA 4. Vstrebávanie cholesterolu a aktivita HMG-CoA reduktázy v pečňových mikrozómoch potkanov.

TABLE 4. Cholesterol absorption and HMG-CoA reductase activity in liver microsomes of rats.

Parameter ¹	DIÉTA ²	
	kontrolná ³	s hľivou ⁴
Vstrebávanie cholesterolu ⁵ [%]	61,6 \pm 2,4	52,9 \pm 2,0 ^b
HMG-CoA reduktáza ⁺⁶	[pmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteínu] ⁹	
1. nízkocholesterolová diéta ⁷	237 \pm 22	160 \pm 16 ^c
2. vysokocholesterolová diéta ⁸	137 \pm 16	86 \pm 9 ^b

Hodnoty sú priemery \pm SEM z 8 zvierat v oboch skupinách. Štatistická preukaznosť pozri tab. 1.

+ - 3-hydroxy-3-metylglutaryl CoA reduktáza.

Vysokocholesterolová diéta obsahovala 0,3 %, nízkocholesterolová 0,009 % cholesterolu.

Values are means \pm SEM for 8 animals per group. Statistical significance - see Table 1.

Content of cholesterol in high and low cholesterol diet was 0.3 and 0.009 % respectively.

1 - parameter, 2 - diet, 3 - control, 4 - with oyster mushroom, 5 - cholesterol absorption, 6 - HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA) reductase, 7 - low cholesterol diet, 8 - high cholesterol diet, 9 - [pmol.min⁻¹.mg⁻¹of protein].

na sušinu). Steroly hľivy (0,2 % na sušinu) môžu kompetitívnou inhibíciou znižovať vstrebávanie cholesterolu [29]. So žľčovými kyselinami sú schopné interakcií aj nestrávené zvyšky proteínov [30] a chitín, ktorý sa v tenkom čreve pravdepodobne transformuje na chitozán [31]. Pokles biosyntézy cholesterolu pod vplyvom hľivy je evidentným dôsledkom prítomnosti mevinolínu (pôvodne objavený v nižších hubách, predchodca dnešných vysokoúčinných hypocholesterolemických farmák - statínov) v hľive [32], ktorý je kompetitívnym inhibítorom HMG-CoA reduktázy a zvyšuje expresiu apo B/E receptorov v pečeni [33]. Tieto údaje podporujú našu predstavu o stimulácii apo B/E receptorového katabolizmu cholesterolu pod vplyvom hľivy.

Katabolizmus cholesterolu

Naše zistenie, že hľiva v diéte urýchľuje frakčný katabolizmus lipoproteínov všetkých tried i frakčný katabolizmus celkového plazmatického cholesterolu [34,35] nás viedli k predstave, že hľiva urýchľuje katabolizmus cholesterolu na žľčové kyseliny. Tento proces prebieha výlučne v pečeni, pričom enzýmom limitujúcim rýchlosť tejto reakcie je mikrozomálna 7- α -hydroxyláza [36]. Z výsledkov v tabuľke 5. vidíme, že hľiva pri nezmenenom množstve vylúčenej stolice signifikantne zvýšila exkréciu neutrálnych sterolov (o 32 %) a o viac ako 50 % exkréciu žľčových kyselín. Aktivita kľúčového enzýmu 7- α -hydroxylázy bola o 33 % zvýšená pri diéte s hľivou. Zvýšenému katabolizmu cholesterolu zodpovedá aj výrazne (o 42 %) zvýšená frakčná katabolická rýchlosť plazmatického cholesterolu. Za uvedený efekt hľivy sú pravdepodobne zodpovedné už spomínané látky (β -glukán, pektín, lignín, nestrávené zvyšky proteínov, chitín-chitozán). Zväčšená exkrécia žľčových kyselín viedla k obmedzeniu ich enterohepatálnej cirkulácie, k spätnou väzbou podmienenej stimulácii aktivity 7- α -hydroxylázy a v konečnom výsledku k urýchleniu katabolizmu cholesterolu [28]. Dokázalo sa, že pri syntéze žľčových kyselín je ako zdroj preferovaný voľný cholesterol „prinesený“ do pečene lipoproteínmi [37]. Je preto možné uvažovať, že urýchlenie frakčného obratu lipoproteínov nesúcich cholesterol je podmienené zvýšeným nárokom pečene na prísun cholesterolu pre zvýšenú tvorbu žľčových kyselín na doplnenie ich strát zvýšenou exkréciou. Hľiva v diéte signifikantne zvýšila aktivity enzýmu lecitín:cholesterol acyltransferázy v sére. Tento enzým katalyzuje esterifikáciu voľného cholesterolu, „vychytaného“ nascentnými diskovitými prekurzormi HDL a má rozhodujúci význam pri spätnom transporte cholesterolu uskutočňovaným HDL. Homeostáza cholesterolu je regulovaná tromi vzájomne súvisiacimi spätnoväzobnými mechanizmami: reguláciou produkcie LDL receptorov, HMG-CoA reduktázy a 7- α -hydroxylázy. Z výsledkov je zrejmé, že hľiva v diéte zasahuje do regulácie uvedených dejov s jednoznačným konečným výsledkom: efektívne znižuje hypercholesterolémiu a akumuláciu cholesterolu v pečeni, ktorá bola indukovaná cholesterolovou diétou.

TABUĽKA 5. Fekálna exkrécia steroidov, aktivita cholesterol 7- α -hydroxylázy a LCAT a frakčná katabolická rýchlosť plazmatického cholesterolu (FCR).

TABLE 5. Fecal excretion of steroids, 7- α -hydroxylase and LCAT activities and plasma cholesterol fractional catabolic rate in rats.

Parameter ¹	DIÉTA ²	
	kontrolná ³	s hľivou ⁴
Stolica [g.deň ⁻¹ na potkana] ⁵	4,3 \pm 0,32	4,8 \pm 0,38
	[mg.deň ⁻¹ na potkana] ¹⁵	
Celkové neutrálne steroly ⁶	8,98 \pm 0,68	11,87 \pm 0,95 ^a
Celkové žľčové kyseliny ⁷	7,03 \pm 0,86	10,87 \pm 0,54 ^d
Kyselina cholová ⁸	0,62 \pm 0,01	2,47 \pm 0,55
Kyselina deoxycholová ⁹	4,65 \pm 0,63	5,99 \pm 0,29
Kyselina lithocholová ¹⁰	0,78 \pm 0,23	0,59 \pm 0,07
Kyselina hyodeoxycholová ¹¹	0,98 \pm 0,11	1,82 \pm 0,17 ^e
C 7- α -hydroxyláza ⁺ [pmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteínov] ¹²	17,19 \pm 1,34	22,84 \pm 1,33 ^b
LCAT ⁺⁺ [%·h ⁻¹] ¹³	68,66 \pm 0,62	77,42 \pm 0,64 ^c
FCR cholesterolu [deň ⁻¹] ¹⁴	0,0969 \pm 0,150	0,1376 \pm 0,0184 ^a

Hodnoty sú priemery \pm SEM z 10 zvierat v oboch skupinách. Štatistická preukaznosť pozri tab. 1.

+ - cholesterol 7- α -hydroxyláza, ++ - lecitín : cholesterol acyltransferáza.

Values are means \pm SEM for 10 animals per group. Statistical significance - see Table 1.

+ - cholesterol 7- α -hydroxylase, ++ - lecithin : cholesterol acyltransferase.

1 - parameter, 2 - diet, 3 - control, 4 - with oyster mushroom, 5 - faeces [g.day⁻¹ per rat], 6 - total neutral sterols, 7 - total bile acids, 8 - cholic acid, 9 - deoxycholic acid, 10 - lithocholic acid, 11 - hyodeoxycholic acid, 12 - cholesterol 7- α -hydroxylase [pmol.min⁻¹.mg⁻¹ of protein], 13 - lecithin : cholesterol acyltransferase [%·h⁻¹], 14 - fractional catabolic rate of cholesterol [day⁻¹], 15 - [mg.day⁻¹ per rat].

Peroxidácia lipidov a aktivita antioxidačných enzýmov

Z výsledkov v tabuľke 6. vyplýva, že hľiva v diéte výrazne (o 35-40 %) znížila koncentráciu konjugovaných diénov v erytrocytoch i pečeni a hydroperoxidov v plazme a pečeni. Signifikantne bola znížená tvorba produktov reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (malondialdehyd). Aktivity superoxiddizmutázy, katalázy i glutatiónperoxidázy v pečeni boli pod vplyvom hľivy výrazne zvýšené. Viacerí autori ukázali, že cholesterolová diéta vyvoláva prooxidačný stav organizmu, charakterizovaný zvýšeným obsahom peroxidov lipidov v pečeni, poklesom aktivít od glutatiónu závislého detoxikačného systému [38,39] a zvýšenou vnímavosťou LDL k peroxidácii [40]. Zatiaľ bližšie neznáme látky

TABULKA 6. Peroxidácia lipidov a aktivity antioxidačných enzýmov v pečeni potkanov.
TABLE 6. Lipid peroxidation and liver antioxidant enzyme activities of rats.

	DIÉTA ¹	
	kontrolná ²	s hľivou ³
KONJUGOVANÉ DIÉNY ⁴		
erytrocyty ⁵ [D.ml ⁻¹]	9,50 ± 1,1	5,41 ± 0,86 ^c
pečeň ⁶ [d.g ⁻¹]	7,70 ± 0,53	4,97 ± 0,21
HYDROPEROXIDY ⁷		
plazma ⁸ [μmol.ml ⁻¹]	0,83 ± 0,07	0,48 ± 0,04 ^d
pečeň ⁹ [μmol.g ⁻¹]	1,04 ± 0,11	0,57 ± 0,04 ^c
TBARS [μmol.g ⁻¹ proteínu] ¹⁰	30,37 ± 1,03	23,17 ± 2,05 ^c
SOD [U.mg ⁻¹ proteínu] ¹¹	9,54 ± 0,75	16,97 ± 1,02 ^e
KAT [U.mg ⁻¹ proteínu] ¹²	6,58 ± 0,37	8,65 ± 0,51 ^c
GSH-Px [10 ⁻² .U.mg ⁻¹ proteínu] ¹³	8,05 ± 0,32	14,12 ± 0,95 ^e

Hodnoty sú priemery ± SEM z 10 zvierat v oboch skupinách. Štatistická preukaznosť pozri tab. 1.

TBARS - množstvo produktov reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou, SOD - superoxid-dizmutáza, KAT - kataláza, GSH-Px - glutatiónpoxidáza.

Values are means ± SEM for 10 animals per group. Statistical significance - see Table 1.

1 - diet, 2 - control, 3 - with oyster mushroom, 4 - conjugated dienes, 5 - erythrocytes; 6 - liver, 7 - hydroperoxides, 8 - plasma, 9 - liver, 10 - net production of thiobarbituric acid-reactive substances [μmol.g⁻¹ of protein], 11 - superoxide dismutase [U.mg⁻¹ of protein], 12 - catalase [U.mg⁻¹ of protein], 13 - glutathione peroxidase [10⁻².U.mg⁻¹ of protein].

hlivy sú zrejme schopné zvyšovať aktivity antioxidačných enzýmov ako reakciu na ich zvýšenú potrebu. Získané údaje sú v súhlase s antilipoperoxidačným efektom extraktu hľivy *in vitro* [41] a môžu byť dávané do súvisu so schopnosťou karboxymetylglukánov zhašať OH radikály. Antimutagénne, antikarcinogénne a imunostimulačné účinky β-glukánov sú významným dielom pripisované ich schopnostiam zhašať voľné radikály [42].

Záver

Hľiva ustricovitá efektívne brzdila akumuláciu cholesterolu v krvi a pečeni u potkanov kŕmených cholesterolovou diétou. Tento efekt je výsledkom spomalenia vstrebávania a biosyntézy cholesterolu a na druhej strane urýchlenia jeho katabolizmu pod vplyvom hľivy v diéte. Potvrdil sa antilipoperoxidačný efekt hľivy ustricovitej.

Literatúra

1. STAMLER, J. - WETHWORTH, D. - NEATON, J. D.: *J. Amer. med. Assoc.*, 256, 1986, s. 2823.
2. STEINBERG, D. - PARTHASARATHI, S. - CAREW, T. E. - KGHOO, J. C. - WITZUM, J. L.: *New. J. engl. Med.*, 320, 1989, s. 915.
3. SUN, M. - ZIAO, J. - ZHANG, S.: *Acta nutr. sinica*, 6, 1984, s. 127.
4. BOBEK, P. - GINTER, E. - KUNIAK, L. - BABALA, J. - JURČOVIČOVÁ, M. - OZDÍN, L. - ČERVEN, J.: *Nutrition*, 7, 1991, s. 105.
5. BOBEK, P. - GINTER, E. - JURČOVIČOVÁ, M. - OZDÍN, L. - MEKIŠOVÁ, D.: *Physiol. Res.*, 40, 1991, s. 327.
6. BOBEK, P. - CHORVÁTHOVÁ, V. - GINTER, E.: *Biológia*, 46, 1991, s. 1025.
7. BOBEK, P. - GINTER, E. - JURČOVIČOVÁ, M. - KUNIAK, L.: *Ann. Nutr. Metab.*, 35, 1991, s. 191.
8. YAMASHITA, S. - YAMASHITA, K. - YASUDA, H.: *Endocrin. Jap.*, 27, 1980, s. 169.
9. ZLATKIS, A. - ZAK, B. - BOYLE, A. J.: *J. Lab. clin. Med.*, 41, 1953, s. 486.
10. HAVEL, R. J. - EDER, H. A. - BRAGDON, J. H.: *J. clin. Invest.*, 34, 1955, s. 1345.
11. OTTWAY, S. - ROBINSON, D. S.: *J. Physiol.*, 190, 1967, s. 321.
12. DUERDEN, J. M. - MARSH, B. - BURNHAM, J. F. - GIBBONS, G. F.: *Biochem. J.*, 271, 1990, s. 761.
13. GREGG, R. C. - DIAMOND, A. - MONDON, C. E. - REAVEN, G. M.: *Metabolism*, 26, 1977, s. 875.
14. FIDGE, N. H. - POLIS, P.: *Clin. chim. Acta*, 52, 1974, s. 5.
15. ZILVERSMIT, D. B. - HUGHES, L. B.: *J. Lipid Res.*, 15, 1974, s. 465.
16. SHAPIRO, D. J.: *Biochem. biophys. Acta*, 37, 1974, s. 369.
17. UCHIDA, K. - NOMURA, Y. - KADOWAKI, M. - TAKEUCHI, N. - YAMAMURA, Y.: *Japan. J. Pharmacol.*, 27, 1977, s. 193.
18. MITROPOULOS, K. A. - BALASUBRAMANIAM, S.: *Biochem. J.*, 128, 1972, s. 1.
19. RECKNAGEL, R. - GLENDE, E. A.: In: Colowick, S. R. - Kaplan, N. O.: Eds. *Methods in Enzymology*. San Diego, Academic Press 1984, s. 331.
20. PRYOR, W. A. - CASTEL, L.: In: Colowick, S. R. - Kaplan, N. O.: Eds. *Methods in Enzymology*. San Diego, Academic Press 1984, s. 293.
21. DEVASAGYAM, T. P. P.: *FEBS*, 199, 1986, s. 203.
22. CAVAROCHI, N. C. - ENGLAND, M. O. - O'BRIAN, J. F.: *J. Surg. Res.*, 40, 1986, s. 519.
23. PAGLIA, D. E. - VALENTINE, W. N.: *J. Lab. clin. Med.*, 70, 1967, s. 158.
24. VANCE, J. E. - VANCE, D. E.: *Experientia*, 46, 1990, s. 560.
25. FUNGWE, T. V. - CAGEN, L. - WILCOX, H. G. - HEIMBERG, M.: *J. Lipid Res.*, 33, 1992, s. 179.
26. GRUNDY, S. M.: *A. Rev. Nutr.*, 1, 1984, s. 71.
27. BERKEL VAN, T. H. J. C. - KUIPERS, R. J. - BAKKEREN, H. F.: *Cells. Hepat. Sinusoid*, 3, 1991, s. 483.
28. VAHOUNY, G. V. - TOMBES, R. - CASSIDY, M. M. - KRITCHEVSKY, D. - GALLO, L. L.: *Lipids*, 15, 1980, s. 1012.
29. IKEDA, I. - TANAKA, K. - SUGANO, M. - VAHOUNY, G. V. - GALLO, L. L.: *J. Lipid Res.*, 29, 1988, s. 1573.
30. SUGANO, M. - YAMADA, Y. - YOSHIMA, K. - HASIMOTO, Y. - KYMOTO, M.: *Atherosclerosis*, 72, 1988, s. 115.
31. ZEMEK, J. - KUČAR, Š. - ANDERLE, D.: *Coll. Czech. chem. Commun.*, 52, 1987, s. 2347.
32. GUNDE-CIMERMAN, N. - FRIEDRICH, J. - CIMERMAN, A. - BENÍČKI, N.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 111, 1993, s. 203.
33. RUSSELL, D. W.: *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 6, 1992, s. 103.
34. BOBEK, P. - KUNIAK, L. - OZDÍN, L.: *Ann. Nutr. Metab.*, 37, 1993, s. 142.
35. BOBEK, P. - GINTER, E. - OZDÍN, L.: *Nutr. Res.*, 13, 1993, s. 885.

36. MYANT, N. B. - MITROPOULOS, K. A.: J. Lipid Res., 19, 1977, s. 135.
37. BJÖRKEM, I. - LEVENHAUPT, A.: J. biol. Chem., 254, 1979, s. 5252.
38. UYSAL, M. - KUTALP, G. - SECKIN, S.: Internat. J. Vitam. Nutr. Res., 58, 1988, s. 339.
39. HEINLE, H. - BETZ, E.: Arzneimittelforschung/Drug Res., 44, 1994, s. 614.
40. NENSETER, M. S. - GUDMUNDSEN, O. - MALTERUD, K. E. - Berg, T. - DREVON, C. A.: Biochim. biophys. Acta, 1213, 1994, s. 513.
41. FILÍPEK, J.: Pharmazie, 47, 1992, s. 393.
42. STAVRIC, B.: Fd chem. Toxicol., 32, 1994, s. 79.

Do redakcie došlo 11.6.1996.

Mechanism of hypocholesterolemic effect of dietary oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypercholesterolemic rats

PAVEL BOBEK - LUBOMÍR OZDÍN - LUDEVÍT KUNIAK - MELITA HROMADOVÁ

SUMMARY. In series of experiments with male wistar rats, it was found that supplementation of cholesterol (0.3 %) diet with 5 % of dried oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) significantly decreased cholesterol absorption and biosynthesis in 8-10 weeks. A significant decrease of the cholesterol-enriched very-low-density lipoproteins production was found. Catabolism of all cholesterol-carrying lipoproteins as well as production and fecal excretion of neutral sterols and of bile acids increased. Oyster mushroom, affecting absorption, biosynthesis and catabolism of cholesterol, caused diminishing of dietary cholesterol accumulation in plasma and liver.