

Tadeusz MIERZEJEWSKI, Adam KADZIOŁKA,
Beata SŁOWIKOWSKA

**Metabolizm błony wewnętrznej aorty świń. Cz. II. Aktywność lipolityczna
w wyciągach homogenatów intymy i medii tętnicy głównej ze zmianami
i bez zmian arteriosklerotycznych**

Метаболизм интимальной оболочки аорты свиней. Ч. II. Липолитическая активность
в экстрактах гомогенизатов интимальной и медиальной оболочек аорты
артерioskлерозно измененной и неизмененной

Metabolism of Intima of the Pig's Aorta. II. Lipolytic Activity in the Extracts of
Intima and Media Homogenates of the Main Artery with, and without, Arterio-
sclerotic Changes

W ostatnim dziesięcioleciu badania rozwijane w oparciu o metaboliczno-infiltracyjną teorię patogenezy miażdżycy skoncentrowano na czynności metabolicznej tętnicy głównej (3). Sugestie, że aktywność hydrolaz estrów kwasów tłuszczowych zapobiega gromadzeniu się lipidów w ścianie aorty (16, 18), skupiły na tych enzymach uwagę wielu autorów, którzy w licznych pracach (1, 2, 5, 6, 10—17) wykazali w ścianie tętnicy głównej u zwierząt i człowieka enzymy hydrolizujące estry wyższych kwasów tłuszczowych. W aorcie u świni Patelski i wsp. wykazali obecność: lipazy, fosfolipazy A i esterazy cholesterolowej (11), określili właściwości tych enzymów (10, 11) oraz podali kolejność poziomów ich specyficznej aktywności w następującym porządku: esteraza cholesterolowa $\leq$ lipaza $\leq$ fosfolipaza A (11, 14). W doświadczalnej arteriosklerozie szczurów i królików zmiany w aktywności enzymów lipolitycznych aorty, a mianowicie spadek aktywności esterazy cholesterolowej oraz wzrost aktywności lipazy i fosfolipazy A, wyprzedzały wystąpienie zmian proliferacyjno-zwyrodnieniowych w błonie wewnętrznej tętnicy głównej (12, 13).

W badaniach porównawczych nad miażdżycą właściwy model badawczy stanowią świnię, ponieważ u tych zwierząt występuje w dużym odsetku naturalna arterioskleroza. Postanowiono sprawdzić, czy i o ile zmienia się aktywność lipolityczna w błonie wewnętrznej aorty w procesie samoistnej arteriosklerozy. W tym celu skonfrontowano aktywność lipolityczną w wyciągach homogenatów błony wewnętrznej tętnicy głównej świń z dostrzeżonymi i nie-dostrzeżonymi zmianami miażdżycopodobnymi.

MATERIAŁ I METODY

Od kilkudziesięciu świń rasy białej polskiej, o ciężarze około 100 kg, natychmiast po uboju izolowano odcinki piersiowe i brzuszne aort, umieszczając je w pojemnikach z lodem, następnie przemywano je chłodną wodą ok. $+7^{\circ}\text{C}$,

rozcinano i osuszano bibułą filtracyjną i po ocenie makroskopowej oddzielano błony wewnętrzne, które następnie zamrażano (3). Wybrano 14 aort z wyraźnie makroskopowo dostrzegalnymi płytkami arteriosklerotycznymi — grupa A, oraz 14 aort, na których gołym okiem nie stwierdzano zmian stwardnieńowych — grupa Bz. Ocenę makroskopową badanych aort weryfikowano histopatologicznie, stosując w mrożonych preparatach histopatologicznych barwienie roztworami Sudanów III i czarnego (3). Zdjęte i zamrożone błony wewnętrzne i częściowo środkowe grup Bz i A rozdrabniano skalpelem w moździerzach umieszczonych w lodzie, a następnie rozcierano z pyłem szklanym na miazgę, dodając porcjami zimny (0°C) 15% roztwór glicerolu w 0,2 M, pH 8,3 bufone tris w ilości 5 ml na 1 g tkanki. Dezintegrat wirowano w chłodni o temp. +2°C przy 10 000 ob/min. przez 15 min. Supernatant, bezpośrednio po odwirowaniu, preinkubowano 10 min. w temp. +37°C na łaźni wodnej i użyto do oznaczeń aktywności lipolitycznej=ALp.

ALp oznaczano w oparciu o metodą opisaną przez Śliwińską (wg 4) w następującym układzie: 1 ml preinkubowanego wyciągu +5 ml hydrosolu oliwy z oliwek w buforze tris 0,02 M pH 8,3. Inkubację prowadzono w temp. +37°C przez 1 godzinę. Reakcję przerywano przez dodanie do inkubatu 15 ml 96% etanolu. W 10 ml etanolowego przesączu oznaczano nieestryfikowane kwasy tłuszczowe 0,01 N NaOH. Kontrolę stanowiły inkubaty substratu bez wyciągu, wyciągu bez substratu i inkubowanego substratu, do którego dodawano etanol, a następnie inkubowany wyciąg.

Za jednostkę lipolityczną=ILp przyjęto proponowaną przez Śliwińską jednostkę dla lipazy, tj. 0,1 ml 0,01 N NaOH. ALp wyrażono w ILp/1 g białka wyciągu/1 godz. Dokładność metody sprawdzano przeprowadzając 10 oznaczeń tej samej próbki. Współczynnik zmienności tych wyników wynosił 8,6%. Wszystkie oznaczenia przeprowadzano trzykrotnie. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną oznaczeń. Białko w wyciągach oznaczano metodą Lowry (wg 7). Odczynniki do preparacji i oznaczeń, poza oliwą z oliwek, zastosowano czyste p.a.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki oznaczeń ALp wyciągów grupy Bz i A zestawiają tab. 1 i 2. Informują one że:

1) wyciągi Bz i A zawierały układ enzymatyczny katalizujący reakcje hydrolizy estrów kwasów tłuszczowych, którego aktywność można było ozna-

Tab. 1. ALp = ILp/1 g białka/1 godz., wyciągów grup Bz i A
ALp = ILp/1 g of protein/1 hr of the group extracts Bz and A

L.p.	ALp		L.p.	ALp	
	Bz	A		Bz	A
1	310	2240	8	430	1640
2	830	1870	9	60	920
3	110	1700	10	70	1000
4	130	1040	11	380	870
5	140	1320	12	570	1760
6	460	3200	13	130	1680
7	780	1950	14	180	1850

Tab. 2. ALp = ILp/1 g białka/1 godz., wyciągów grup Bz i A, wartości średnie $\bar{x}$, odchylenia standardowe S, 99%% półprzedniej ufności dla wartości średniej ALp = ILp/1 g of protein/1 hr of the group extracts Bz and A, mean values $\bar{x}$, deviation S, 99%% of half-interstitial confidence for the mean value

	Grupa Bz	Grupa A
Liczebność n	14	14
Wartość średnia $\bar{x}$	327,14	1645,71
Odchylenie standardo- we S	248,9	596,9
Półprzedział ufności	$\pm 207,94$	$\pm 498,74$

czyć przez miareczkowanie zasadą sodową kwasów uwolnionych z hydrosolu oliwy z oliwek,

2) ALp wyciągów grupy A była znacznie wyższa od ALp wyciągów grupy Bz.

W tab. 2 zestawiono wartości średnie, odchylenie standardowe oraz 99-procentowe półprzedziały ufności dla wartości średniej ALp grup Bz i A. Konfrontację ALp w badanych wyciągach (Bz i A) przeprowadzono testem równości średnich dwóch populacji normalnych (19). W tym celu wykonano obliczenia statystyczne posługując się wzorem:

$$v = \frac{\bar{B}_z - \bar{A}}{\sqrt{\frac{S^2}{n} + \frac{S^2}{m}}} \quad \text{oraz} \quad c = \frac{S^2/n}{S^2/n + S^2/m}$$

$v_1 = n - 1$; $v_2 = m - 1$; dla zweryfikowania hipotezy zerowej $B_z - A = 0$, przy hipotezie alternatywnej $B_z - A < 0$.

$$v = \frac{1645,71 - 327,14}{\sqrt{\frac{61948,95 + 356367,29}{14}}} = 7,628$$

$$c = \frac{356367,29}{69948,95 + 356367,29} = 0,85$$

Przy czym ilość stopni swobody $v_1 = v_2 = 13$.

Odczytana z tablic (19) wartość V (0,85, 13, 13, 0,005) wynosi 2,86. Ponieważ $V = 7,628$ jest większe od wartości granicznej, należy odrzucić hipotezę o równości średnich, a przyjąć, że różnice ALp grup Bz i A są wysoce istotne $\alpha = 0,005$.

Zaznaczyć należy, że poziomy ALp oznaczane w niniejszej pracy uwarunkowane były głównie aktywnością lipazy glicerydowej, co wykazano w poprzednich publikacjach (8, 9). W związku z tym wyniki naszych badań, przeprowadzone na wyciągach dezintegratów błony wewnętrznej aort świń z samoistną arteriosklerozą, są zgodne ze stwierdzeniami autorów (12, 13), którzy oznaczali wzrost aktywności lipazy w doświadczalnej arteriosklerozie szczurów i królików.

PIŚMIENNICTWO

1. Day A. J., Gould-Hurst P. R. S.: Cholesterol Esterase Activity of Normal and Atherosclerotic Rabbit Aorta. *Biochim. biophys. Acta*, 116, 169, 1966.
2. Eisenberg S., Stein Y., Stein O.: Phospholipase in Arterial Tissue. *Biochim. biophys. Acta*, 164, 205, 1968.
3. Kądziołka A., Mierzejewski T., Ruciński T., Nowak J.: Metabolizm błony wewnętrznej aorty świni. Cz. I. Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania związków tłuszczowych w ścianie aorty świni z dostrzegalnymi i niedostrzegalnymi zmianami arteriosklerotycznymi. (w druku), 1974.
4. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice. PZWL, Warszawa 1969.
5. Korn E. D.: Clearing Factor, a Heparin-Activated Lipoprotein Lipase. *J. Biol. Chem.*, 215, 1, 1955.
6. Maier N.: Metabolism of Arterial Tissue and its Relation to Atherosclerosis. *Annals of the N.Y. Acad. of Sci.*, 149, 655, 1968.
7. Mejbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I.: Kolorymetryczne oznaczanie białek odczynnikami Folina i Ciocalteu. Metoda Lowry'ego. Kurs praktyczny z biochemii. PWN, Warszawa 1969.
8. Mierzejewski T.: Aktywność lipolityczna osocza w doświadczalnej arteriosklerozie kogutów. *Med. Wet.* (w druku), 1974.
9. Mierzejewski T.: Wpływ kumaryny na aktywność lipolityczną w hiperlipemicznym osoczu kogutów. *Med. Wet.* (w druku), 1974.
10. Patelski J.: Esteraza cholesterolowa tętnicy głównej. PZWL, Warszawa 1964.
11. Patelski J., Waligóra Z., Szulc S.: Demonstration and some Properties of the Phospholipase A, Lipase and Cholesterol Esterase from the Aortic Wall. *J. Atheroscler. Res.*, 7, 453, 1967.
12. Patelski J., Bowyer D. E., Howard A. N., Gresham A. G.: Changes in Phospholipase A, Lipase and Cholesterol Esterase Activity in the Aorta in Experimental Atherosclerosis in the Rabbit and Rat. *J. Atheroscler. Res.*, 8, 221, 1968.
13. Patelski J., Bowyer D. E., Howard A. N., i in.: Modification of Enzyme Activities in Experimental Atherosclerosis in the Rabbit. *Atherosclerosis*, 12, 41, 1970.
14. Patelski J., Waligóra Z., Szulc S.: Investigation of the Aortic Phospholipase A, Lipase and Cholesterol Esterase. *Enzyme*, 12, 299, 1971.
15. Smith E. B.: The Influence of Age and Atherosclerosis on the Chemistry of Aortic Intima. *J. Atheroscler. Res.*, 5, 224, 1965.
16. Zemlenyi T., Lojda Z., Grafnetter D.: Relationship of Lipolytic and Esterolytic Activity of the Aorta to Susceptibility to Experimental Atherosclerosis. *Circulation Res.*, 7, 286, 1959.
17. Zemlenyi T.: Enzymes of the Arterial Wall. *J. Atheroscler. Res.*, 2, 2, 1962.
18. Zemlenyi T.: The Lipolytic and Esterolytic Activity of Blood and Tissue and Problems of Atherosclerosis. *Advances in Lipid Research*, Acad. Press, New York—London, 1964.
19. Zieliński R.: Tablice statystyczne. PWN, Warszawa 1972.

Wpl. 27 V 74.

РЕЗЮМЕ

После убоя свиней были взяты грудные и брюшные отрезки аорт. Эти отрезки положили в лед, потом промыли холодной водой (около +7°C), порезали, просушили на фильтровальной бумаге, отделили интимальную оболочку с частью медиальной и заморозили. Замороженные оболочки раздрабляли скальпелем в супках, держащих во льду, и утирали вместе со стекланной пылью на мезгу, добавляя порциями холодный (0°C) 15% раствор глицерина в буфере Трис (в пропорциях 5 мл 15% глицерина на 1 г ткани).

На основе метода, представленного Сьливинской в экстрактах гемогенизатов 14 оболочек с макроскопически заметными артериосклеротическими изменениями (A) и 14 оболочек артериосклеротично неизмененных (Bz) определено липолитическую активность (ALp). За единицу липолитической активности (ILp) принято 0,1 мл. 0,01 NaOH.

ALp выражено в ILp (1 г белка экстракта) 1 час. Белок определено методом Лоури.

Сопоставление A в экстрактах гомогенизатов A и Bz проведено при помощи теста средних равенности двух нормальных популяций. Разницы ALp экстрактов Bz и A были весьма существенные $\alpha=0,005$.

SUMMARY

Immediately after slaughter the thoracic and abdominal sections of pigs' aortas were isolated, then placed in ice, washed in cool water (ca. $+7^{\circ}\text{C}$), dissected and dried with filter paper. Next, the intima and a part of the media were isolated and frozen. The frozen membranes were comminuted in mortars placed in ice, reduced to a pulp and mixed with glassy dust; to this was added in portions cold (0°C) 15 per cent glycerol solution in buffer tris in the relation: 5 ml of 15 per cent glycerol per 1 g of tissue.

On the basis of the method described by Śliwińska, the lipolytic activity (ALp) was determined in the extracts of homogenates of 14 membranes with arteriosclerotic changes (A) observable macroscopically and 14 membranes without such changes (Bz). 0.1 ml of 0.01 N NaOH was accepted as a lipolytic activity unit (ILp).

ALp was expressed in ILp/1 g of protein of extract/1 hr. The protein was determined by Lowry's method.

A confrontation of ALp in the extracts of A and Bz homogenates was carried out by the mean identities test of two normal populations.

The ALp differences of Bz and A extracts were highly significant $\alpha = 0.005$.