

MAGDALENA MIKA<sup>1</sup>, RENATA BARBARA KOSTOGRYS<sup>2</sup>,  
MAGDALENA FRAN CZYK-ŻARÓW<sup>2</sup>, AGNIESZKA WIKIERA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Żywności  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

<sup>2</sup>Katedra Żywienia Człowieka  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

## WPLYW DAWKI KATECHIN MODYFIKOWANYCH TERMICZNIE NA HAMOWANIE ROZWOJU MIAŻDŻYCY U MYSZY apoE-KNOCKOUT

DOSE EFFECT OF THERMALLY MODIFIED CATECHINS  
ON THE INHIBITION OF ATHEROSCLEROSIS IN apoE-KNOCKOUT MICE

**Streszczenie.** Znany jest korzystny wpływ katechin zielonej herbaty na zdrowie człowieka, jednak interesującym i ciągle mało poznanym zagadnieniem jest wpływ modyfikacji termicznej na bioaktywność katechin. Celem niniejszej pracy było ustalenie dawki modyfikowanych termicznie katechin, przy której obserwowane jest najefektywniejsze hamowanie procesów inicjowania i progresji miażdżycy u myszy apoE-knockout. Rozwój miażdżycy oceniono na podstawie analizy zmian miażdżycowych: w aorcie metodą *en face* i w sercu metodą *cross-section*. Najefektywniej działały katechiny w dawce 0,1%. Zmniejszyły one powierzchnię zmian miażdżycowych o 27,0% (metoda *en face*) i 44,2% (metoda *cross-section*) względem grupy kontrolnej. Ponadto wprowadzone do diety katechiny modyfikowane termicznie w dawkach 0,1% i 0,2% powodowały zmniejszenie przyrostu masy ciała zwierząt w przeliczeniu na 1 g spożytej diety.

**Słowa kluczowe:** katechiny, (-) form (2S, 3R), miażdżycy, cholesterol, myszy apoE-knockout

### Wstęp

Żywność należy do produktów nietrwałych, o ograniczonym okresie zdatności do spożycia, co najczęściej wynika z zanieczyszczeń mikrobiologicznych i utleniania tłuszczów. W celu przedłużenia trwałości stosowane są konserwanty i antyoksydanty, najczęściej pochodzenia syntetycznego, choć w ostatnich latach rośnie także zainteresowanie naturalnymi antyoksydantami, głównie katechinami zielonej herbaty (Dolatow-

ski i in., 2010; Mika i in., 2009; O'Sullivan i in., 2004; Salejda i in., 2011). W badaniach z użyciem preparatów katechinowych wykazano, że skuteczniej hamują one procesy peroksydacji tłuszczów niż zastosowane w tych samych ilościach syntetyczne antyoksydanty, takie jak  $\delta$ -tokoferol czy BHT (Mika i in., 2009; O'Sullivan i in., 2004). Zaobserwowano również, że preparaty katechinowe poddane modyfikacji termicznej, prowadzącej do 20-procentowego udziału (-) form (2S, 3R), jeszcze efektywniej przeciwdziałają procesom oksydacyjnym (Mika i in., 2009). Znany jest korzystny wpływ katechin zielonej herbaty na zdrowie człowieka (Del Rio i in., 2010), jednak interesującym i ciągle mało poznany zagadnieniem jest wpływ modyfikacji termicznej na bioaktywność katechin. Celem niniejszej pracy było ustalenie dawki katechin modyfikowanych termicznie, przy której obserwowane jest najefektywniejsze hamowanie procesów inicjowania i progresji miażdżycy u myszy apoE-knockout.

## Material i metody

### Przygotowanie preparatu katechin

Do badań zastosowano katechiny zielonej herbaty (Polyphenon 60 zakupione w firmie Sigma-Aldrich), których 5-procentowe wodne roztwory poddawano modyfikacji termicznej. Proces prowadzono w warunkach beztlenowych (roztwory płukano przez 2 min gazowym azotem), w temperaturze 140°C przez 40 min.

### Doświadczenie żywieniowe

Homozygotyczne 10-tygodniowe samce z wyłączonym genem apolipoproteiny E (apoE-knockout) zakupiono w laboratorium Taconic (Dania). Myszy podzielono na cztery grupy liczące po siedem osobników i umieszczono w oddzielnych klatkach (dł. 58,5 cm, szer. 37,5 cm, wys. 20 cm) z nieograniczonym dostępem do pokarmu i wody. Klatki ze zwierzętami umieszczono w klimatyzowanym pomieszczeniu o temperaturze 21°C i wilgotności 55 ±10% z 12-godzinnym naprzemiennym cyklem światło/ciemność. Podczas pierwszych dwóch tygodni doświadczenia, w czasie aklimatyzacji, myszy otrzymywały standardową paszę Altromin (w formie granulatu). Po tym okresie zwierzęta żywiono przez 12 tygodni zmodyfikowaną dietą AIN 93G (Reeves i in., 1993). Przygotowana dieta zawierała: 39,8% skrobi kukurydzianej, 20% masła, 20% kazeiny, 10% sacharozy, 5% celulozy, 3,5% mieszanki mineralnej (AIN-93G-MX), 1% mieszanki witaminowej (AIN-93-VX), 0,3% L-cysteiny, 0,25% cholicy oraz różne ilości modyfikowanych termicznie katechin. Zawartość katechin w diecie wynosiła odpowiednio: 0% s.m. (kontrola), 0,05% s.m., 0,1% s.m. i 0,2% s.m. Dietę sporządzono jednorazowo i rozdzielono na dzienne racje, które przechowywano w temperaturze -20°C. Bezpośrednio przed podaniem zwierzętom mieszanki były łączone z wodą w stosunku 2 : 1 i formowane w placki. Codziennie przed podaniem świeżej porcji karmy niezjedzone resztki zbierano i ważono. Myszy były ważone raz w tygodniu. Po zakończeniu okresu żywienia zwierzęta poddano narkozie poprzez dootrzewnowe podanie tiopentalu (40 mg/kg masy ciała). Po uspianiu z tętnicy nerkowej pobierano krew i umieszczano w próbkach z heparyną. Surowicę oddzielano przez odwirowanie próbek 12 000 × g przez 2 min i przechowywano

w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz. Serce i aortę przed pobraniem przemyto roztworem PBS przez bezpośrednią iniekcję w lewą komorę serca.

Na przeprowadzenie badań na zwierzętach uzyskano zgodę nr 78/VI/2009 z dnia 16 czerwca 2009 roku, wydaną przez I Lokalną Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie.

## Metody analityczne

Zawartość i rodzaj katechin w preparacie po modyfikacji termicznej oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) opisaną przez Lina i in. (1998). Do oznaczeń używano chromatografu cieczowego (Biorad Lab., USA), detektora spektrofotometrycznego ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) oraz kolumny LUNA C18(2) ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ). Stosowano elucję gradientową (0–10 min – 100% fazy A – elucja izokratyczna; 10–25 min – 100%–90% fazy A, 0%–10% fazy B – gradient liniowy; 25–60 min – 90%–70% fazy A, 10%–30% fazy B – gradient liniowy) przy przepływie fazy ruchomej równym 1 ml/min. Jako fazy A użyto roztworu: metanol/kwas mrówkowy/woda redestylowana (20 : 0,3 : 79,7 v/v/v), a jako fazy B – roztworu: metanol/kwas mrówkowy (99,7 : 0,3 v/v).

Stężenie produktów peroksydacji tłuszczów reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBARS) w surowicy krwi zwierząt doświadczalnych oznaczano spektrofotometrycznie, stosując gotowe zestawy analityczne firmy Cell Biolabs. TBARS wyrażono jako liczbę mikromoli dialdehydu malonowego (MDA).

Stężenie cholesterolu całkowitego (Chol) i związanego z lipoproteinami o dużej (HDL) oraz o małej (LDL) gęstości w surowicy krwi myszy oznaczano metodą enzymatyczną, stosując gotowe zestawy analityczne firmy Cormay.

Analizę zmian miażdżycowych metodą *en face* przeprowadzano w rozciętych wzdłużnie aortach utrwalanych w 4-procentowym roztworze formaldehydu w zbuforowanym roztworze fizjologicznym (pH 7,4). Aorty rozcinano, rozpoczynając od łuku do rozdwojenia biodrowego, następnie rozpinano na silikonowych płytkach i barwiono Sudanem IV. Powierzchnię zmian miażdżycowych i całkowitą powierzchnię aorty obliczano z użyciem programu LSM Image Browser.

Analizę zmian miażdżycowych metodą *cross-section* wykonywano w początkowym odcinku aorty wstępującej. Serca myszy umieszczono w żelu OCT (CellPath, Oxford, UK) i zamrożono w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Następnie krojono je, zgodnie z protokołem Elhage i in. (2003), na skrawki kriostatowe o grubości 10  $\mu\text{m}$ . Po utrwaleniu w 4-procentowym roztworze paraformaldehydu skrawki barwiono czerwienią oleistą. Do oceny brano osiem skrawków pobranych co 100  $\mu\text{m}$ , rozpoczynając od miejsca, gdzie wszystkie trzy płatki zastawki aortalnej były widoczne pod mikroskopem. Obrazy skrawków archiwizowano za pomocą aparatu cyfrowego. Całkowitą powierzchnię blaszki miażdżycowej mierzono z użyciem programu LSM Image Browser. Dla każdej myszy średnią wielkość powierzchni miażdżycy obliczano z ośmiu skrawków.

Dane otrzymane z przeprowadzonych eksperymentów analizowano za pomocą programu statystycznego Statgraphics Plus for Windows w wersji 5.1. Wartości średnie wyliczono dla każdej grupy myszy. W celu wykazania różnic pomiędzy wartościami średnimi wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji metodą najmniejszych kwadratów. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem LSD Fishera przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Modyfikowany termicznie preparat katechinowy zawierał 21,7% (-) form (2S, 3R) i 78,3% (-) epiform (2R, 3R), a procentowy udział poszczególnych katechin wynosił: 51,5% EGCG, 15,4% GCG, 10,3% ECG, 2,2% CG, 3,4% EC, 2,3% C.

Średni przyrost masy ciała myszy po 12 tygodniach żywienia dietą wysokotłuszczową z różną zawartością katechin modyfikowanych termicznie wyniósł od 12,8 g do 15,9 g (tab. 1). Największą końcową masę ciała zaobserwowano u myszy otrzymujących dietę wysokotłuszczową z największą dawką katechin. Przyrost masy zwierząt w tej grupie był średnio o 12,8% większy niż w grupie kontrolnej. Z kolei myszy żywnie dietą zawierającą 0,1% katechin miały średnio o 9,2% mniejszy przyrost masy ciała niż myszy z grupy kontrolnej. Dodatek katechin do diety wysokotłuszczowej w ilości 0,1% i 0,2% spowodował mniejszy przyrost masy ciała zwierząt na 1 g spożytej diety. Myszy żywnie dietą wysokotłuszczową z największym dodatkiem katechin (0,2%) wykazywały wzrost łaknienia. Ilość diety spożywanej przez zwierzęta tej grupy była większa średnio o 24,1% w stosunku do myszy z grupy kontrolnej, natomiast ilości pokarmu pobieranego przez zwierzęta z pozostałych grup, żywnych dietą zawierającą 0,05% i 0,1% katechin, nie różniły się od grupy kontrolnej.

Tabela 1. Średnia ilość diety spożytej przez jedną mysz w ciągu tygodnia oraz średni przyrost masy ciała zwierząt w przeliczeniu na 1 g spożytej diety

Table 1. Mean intake of food per one mouse per week and mean body weight gain per 1 g of food intake

| Zawartość katechin w diecie (% s.m.)<br>Content of catechins in the diet (% d.m.) | Początkowa masa ciała<br>Initial body weight (g) | Końcowa masa ciała<br>Final body weight (g) | Ilość diety spożytej przez 1 mysz na tydzień<br>Food intake per 1 mouse per week (g) | Przyrost masy ciała na 1 g spożytej diety<br>Body weight gain per 1 g of food intake (mg) |
|---|--|---|--|---|
| 0   | 25,6 <sup>a</sup>                                | 39,7 <sup>b</sup>                           | 27,5 <sup>a</sup>  | 42,7 <sup>b</sup>   |
| 0,05  | 25,7 <sup>a</sup>                                | 40,2 <sup>b</sup>                           | 27,9 <sup>a</sup>  | 43,3 <sup>b</sup>   |
| 0,1   | 25,3 <sup>a</sup>                                | 38,1 <sup>a</sup>                           | 27,7 <sup>a</sup>  | 38,5 <sup>a</sup>   |
| 0,2   | 25,5 <sup>a</sup>                                | 41,4 <sup>c</sup>                           | 34,1 <sup>b</sup>  | 38,8 <sup>a</sup>   |
| SD  | ±0,3   | ±0,5  | ±0,8   | ±1,1  |

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ).

Mean values within columns designated with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Myszy żywnie dietą wysokotłuszczową zawierającą 0,1% modyfikowanych termicznie katechin miały mniejsze stężenie TG (średnio o 20,5%) i cholesterolu całkowitego (średnio o 26,4%) w surowicy krwi niż myszy w grupie kontrolnej (tab. 2). Modyfikowane termicznie katechiny, niezależnie od dawki, nie wpłynęły na stężenie chole-

Mika, M., Kostogrys, R. B., Franczyk-Żarów, M., Wikiera, A. (2015). Wpływ dawki katechin modyfikowanych termicznie na hamowanie rozwoju miażdżycy u myszy apoE-knockout. *Nauka Przyr. Technol.*, 9, 3, #32. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.3.32

Tabela 2. Poziom cholesterolu, trójglicerydów (TG) oraz kwasu 2-tiobarbiturowego (TBARS) w surowicy krwi myszy po 12 tygodniach doświadczenia żywieniowego

Table 2. Serum levels of cholesterol, triglycerides (TG) and 2-thiobarbituric acid (TBARS) in mice after 12-week experimental period

| Zawartość katechin w diecie (% s.m.)<br>Content of catechins in the diet (% d.m.) | Cholesterol (mmol/l) |                   |                    | TG (mmol/l)       | TBARS (μmol MDA w 1 l)<br>(μmol MDA per 1 l) |
|---|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--|
|   | Chol                 | LDL               | HDL                |                   |  |
| 0   | 87,9 <sup>b</sup>    | 27,7 <sup>b</sup> | 1,33 <sup>a</sup>  | 1,32 <sup>b</sup> | 61,8 <sup>c</sup>                            |
| 0,05  | 87,5 <sup>b</sup>    | 27,5 <sup>b</sup> | 1,61 <sup>ab</sup> | 1,37 <sup>b</sup> | 63,0 <sup>c</sup>                            |
| 0,1   | 64,7 <sup>a</sup>    | 26,4 <sup>b</sup> | 1,75 <sup>b</sup>  | 1,05 <sup>a</sup> | 50,7 <sup>a</sup>                            |
| 0,2   | 83,8 <sup>b</sup>    | 27,0 <sup>b</sup> | 1,68 <sup>b</sup>  | 1,40 <sup>b</sup> | 55,9 <sup>b</sup>                            |
| SD  | ±3,2                 | ±1,3              | ±0,16              | ±0,12             | ±1,7   |

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ).

Mean values within columns designated with different letters differ significantly ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Analiza ilościowa blaszki miażdżycowej w aortach (metoda *en face*) i korzeniach aorty w sercu (metoda *cross-section*) myszy po 12 tygodniach doświadczenia żywieniowego

Table 3. Quantification of atherosclerotic plaque in aortas (*en face* method) and in aortic roots (*cross-section* method) in mice after 12-week experimental period

| Zawartość katechin w diecie (% s.m.)<br>Content of catechins in the diet (% d.m.) | Metoda <i>en face</i> <sup>1</sup><br><i>En face</i> method <sup>1</sup><br>(%) | Metoda <i>cross-section</i> <sup>2</sup><br><i>Cross-section</i> method <sup>2</sup><br>(mm <sup>2</sup> ) |
|---|---|--|
| 0   | 11,1 <sup>c</sup>   | 0,52 <sup>b</sup>  |
| 0,05  | 9,2 <sup>b</sup>  | 0,36 <sup>ab</sup>   |
| 0,1   | 8,1 <sup>a</sup>  | 0,29 <sup>a</sup>  |
| 0,2   | 8,9 <sup>ab</sup>   | 0,32 <sup>ab</sup>   |
| SD  | ±0,58   | ±0,09  |

<sup>1</sup>Wartości średnie obliczono dla sześciu myszy z każdej grupy.

<sup>2</sup>Wartości średnie obliczono dla czterech myszy z każdej grupy.

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Values represent means for six mice per group.

<sup>2</sup>Values represent means for four mice per group.

Mean values within columns designated with different letters differ significantly ( $p < 0,05$ ).

sterolu LDL w surowicy krwi zwierząt, ale zastosowane w wysokich dawkach (0,1% i 0,2%) powodowały znaczące zwiększenie stężenia cholesterolu HDL (tab. 2). Wzrost ten wyniósł odpowiednio 31,7% i 27,3%. Ponadto wprowadzenie do diety wysokich dawek modyfikowanych termicznie katechin skutkowało zmniejszeniem stężenia TBARS w surowicy krwi myszy (tab. 2). Jednak największa dawka katechin, wynosząca 0,2% diety, okazała się mniej skuteczna w redukcji procesów peroksydacji niż dawka wynosząca 0,1% diety.

Katechiny modyfikowane termicznie wprowadzone do diety wysokotłuszczowej skutecznie hamowały rozwój miażdżycy oceniony na podstawie analizy zmian: w aorcie metodą *en face* i w sercu metodą *cross-section* (tab. 3). Najefektywniej działały katechiny w dawce 0,1%. Zmniejszały one powierzchnię zmian miażdżycowych o 27,0% (metoda *en face*) i 44,2% (metoda *cross-section*) względem grupy kontrolnej.

## Dyskusja

Otrzymane wyniki wskazują, że katechiny modyfikowane termicznie zastosowane w odpowiedniej dawce mogą przeciwdziałać otyłości. Wykazano, że wprowadzenie ich w dawkach 0,1% i 0,2% do diety wysokotłuszczowej zwierząt powodowało zmniejszenie przyrostu masy ich ciała w przeliczeniu na 1 g spożytej diety. Spadek ten najprawdopodobniej wynikał z wpływu katechin na zmniejszenie biodostępności tłuszczów z diety. W pracy Miki i in. (2008) wykazano, że katechiny zmniejszają biodostępność tłuszczów z diety. Ponadto inni autorzy wykazali, że katechiny hamują proliferację preadipocytów (Ku i in., 2012) oraz zmniejszają akumulację lipidów w komórkach tłuszczowych (Furuyashiki i in., 2004). Zmniejszona absorpcja tłuszczów w przewodzie pokarmowym w obecności katechin prawdopodobnie wpłynęła również na zmniejszenie stężenia cholesterolu w surowicy krwi myszy żywionych dietą wysokotłuszczową zawierającą 0,1% katechin. Jednak dodatek katechin w największej dawce powodował zwiększenie średnio o 24,1% spożycia paszy przez myszy w tej grupie, co wpłynęło na stosunkowo duże stężenie cholesterolu całkowitego, trójglicerydów i TBARS w surowicy krwi tych zwierząt. Obserwowany wzrost spożycia paszy mógł być spowodowany przez aktywację w podwzgórzku kinazy AMPK, która reguluje procesy łaknienia (Fijałkowski i Jarzyna, 2010). Wiadomo, że EGCG może aktywować kinazę AMPK (Collins i in., 2007; Murase i in., 2009; Zhang i in., 2010).

Nasze badania wykazały, że modyfikowane termicznie katechiny wprowadzone do wysokotłuszczowej diety mogą hamować rozwój miażdżycy, a efekt ich działania zależy od dawki. Miażdżycą jest chorobą o podłożu zapalnym wywołanym przez uszkodzenie śródbłonna naczyń, do którego może dojść w wyniku działania czynników mechanicznych, toksycznych i infekcyjnych. Należy ona do niezakaźnych chorób przewlekłych, a jej rozwojowi sprzyja brak ruchu i nieodpowiednia, bogata w tłuszcze dieta (Kuliczowska-Płaksej i in., 2006). Na rozwój miażdżycy wpływa akumulacja cząsteczek LDL w przestrzeni podśródbłonkowej naczyń krwionośnych. Intensywność odkładania się cząsteczek LDL zależy od ich stężenia w surowicy krwi. Jednak istotne jest, że cząsteczki lipoprotein nie zawierające utlenionych tłuszczów są znacznie wolniej „po-bierane” przez makrofagi niż oxLDL (Pirillo i in., 2013). Z naszych badań wynika, że

katechiny modyfikowane termicznie nie wpłynęły na stężenie lipoprotein o małej gęstości w surowicy krwi myszy, ale zastosowane w dużych dawkach (0,1 i 0,2%) znacząco zmniejszyły stężenie TBARS (tab. 2). Antyoksydacyjne działanie katechin i ich metabolitów obecnych w surowicy krwi hamuje proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych frakcji LDL. Jednak antyoksydacyjna aktywność tych związków nie jest jedynym działaniem hamującym rozwój miażdżycy. Katechiny zielonej herbaty korzystnie wpływają na układ krążenia poprzez indukcję ekspresji genu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu eNOS (Sutherland i in., 2005), jak również zwiększają aktywność tego enzymu poprzez wpływ na jego fosforylację (Lorenz i in., 2009). Spośród natywnych katechin zielonej herbaty tylko EGCG powoduje wzrost syntezy NO. Jednak w literaturze brak informacji o wpływie GCG (powstałego w wyniku modyfikacji termicznej EGCG) na śródbłonkową syntezę tlenu azotu. Ponadto w badaniach na komórkach śródbłonka stwierdzono, że EGCG hamuje ekspresję genu LOX-1 receptora wiążącego oxLDL (Ou i in., 2010). Dodatkowo katechiny redukują poziom homocysteiny w surowicy krwi (Hamelet i in., 2007), której duże stężenie inicjuje i przyspiesza rozwój miażdżycy (Tehlivets, 2011).

## Wniosek

Dodatek do produktów spożywczych odpowiedniej ilości modyfikowanych termicznie katechin stwarza możliwość ograniczenia rozwoju zmian miażdżycowych i otyłości inicjowanych przez spożywanie wysokotłuszczowej żywności.

## Literatura

- Collins, Q. F., Liu, H. Y., Pi, J., Liu, Z., Quon, M. J., Cao, W. (2007). (-)Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 282, 41, 30143–30149.
- Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J. (2010). Crozierpson A. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 20, 1, 1–6.
- Dolatowski, Z. J., Jachacz, L., Kołożyn-Krajewska, D. (2010). Stabilność oksydacyjna modelowego produktu mięsnego z dodatkiem naparu herbaty. W: T. Sikora (red.), *Jakość i bezpieczeństwo żywności wyzwaniem XXI wieku* (s. 26–34). Kraków: Wyd. Nauk. PTTŻ.
- Elhage, R., Jawien, J., Rudling, M., Ljunggren, H. G., Takeda, K. S., Akira, S., Bayard, F., Hansson, G. K. (2003). Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.*, 59, 234–240.
- Fijałkowski, F., Jarzyna, R. (2010). Rola podwzgórzowej kinazy białkowej aktywowanej przez AMP w kontroli pobierania pokarmu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 64, 231–243.
- Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K., Ashida, H. (2004). Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPAR gamma 2 and C/EBP alpha in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 11, 2353–2359.
- Hamelet, J., Demuth, K., Dairou, J., Ledru, A., Paul, J. L., Dupret, J. M., Delabar, J. M., Rodrigues-Lima, F., Janel, N. (2007). Effects of catechin on homocysteine metabolism in hyperhomocysteinemic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 1, 221–227.

- Ku, H. C., Liu, H. S., Hung, P. F., Chen, C. L., Liu, H. C., Chang, H. H., Tsuei, Y. W., Shih, L. J., Lin, C. L., Lin, C. M., Kao, Y. H. (2012). Green tea (-)-epigallocatechin gallate inhibits IGF-I and IGF-II stimulation of 3T3-L1 preadipocyte mitogenesis via the 67-kDa laminin receptor, but not AMP-activated protein kinase pathway. *Mol. Nutr. Food Res.*, 56, 580–592.
- Kuliczowska-Plaksej, J., Bednarek-Tupikowska, G., Plaksej, R., Filus, A. (2006). Receptor CD36 – występowanie, regulacja ekspresji oraz rola w patogenezie miażdżycy. Część I. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 60, 142–151.
- Lin, J. K., Lin, C., Liang, Y., Shiau, S., Juan, I. (1998). Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 9, 3635–3642.
- Lorenz, M., Urban, J., Engelhardt, U., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V. (2009). Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved. *Basic Res. Cardiol.*, 104, 1, 100–110.
- Mika, M., Wikiera, A., Żyła, K. (2008). Effects of non-fermented tea extracts on *in vitro* digestive hydrolysis of lipids and on cholesterol precipitation. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 4, 731–736.
- Mika, M., Wikiera, A., Żyła, K. (2009). Effects of thermally modified green tea catechins on the oxidative and hydrolytic stability of butter. *Health*, 1, 3, 192–196.
- Murase, T., Misawa, K., Haramizu, S., Hase, T. (2009). Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 78, 1, 78–84.
- O’Sullivan, C. M., Lynch, A. M., Lynch, P. B., Buckley, D. J., Kerry, J. P. (2004). Assessment of the antioxidant potential of food ingredients in fresh, previously frozen and cooked chicken patties. *Int. J. Poult. Sci.*, 3, 5, 337–344.
- Ou, H. C., Song, T. Y., Yeh, Y. C., Huang, C. Y., Yang, S. F., Chiu, T. H., Tsai, K. L., Chen, K. L., Wu, Y. J., Tsai, C. S., Chang, L. Y., Kuo, W. W., Lee, S. D. (2010). EGCG protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by inhibiting LOX-1-mediated signaling. *J. Appl. Physiol.*, 108, 6, 1745–1756.
- Pirillo, A., Norata, G. D., Catapano, A. L. (2013). LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediat. Inflamm.*, 2013, ID 152786.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C. (1993). 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.*, 123, 11, 1939–1951.
- Salejda, A. M., Krasnowska, G., Tril, U. (2011). Próba wykorzystania przeciwutleniających właściwości ekstraktu zielonej herbaty w produkcji modelowych przetworów mięsnych. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 78, 5, 107–118.
- Sutherland, B. A., Shaw, O. M., Clarkson, A. N., Jackson, D. N., Sammut, I. A., Appleton, I. (2005). Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin gallate following hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. *FASEB J.*, 19, 2, 258–260.
- Tehlivets, O. (2011). Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: is its conversion to S-adenosyl-L-homocysteine the key to deregulated lipid metabolism? *J. Lipids*, 2011, 702853.
- Zhang, Z. F., Li, Q., Liang, J., Dai, X. Q., Ding, Y., Wang, J. B., Li, Y. (2010). Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. *Phytomedicine*, 17, 1, 14–18.



## DOSE EFFECT OF THERMALLY MODIFIED CATECHINS ON THE INHIBITION OF ATHEROSCLEROSIS IN apoE-KNOCKOUT MICE

**Summary.** Beneficial effects of green tea catechins on human health are known but there is little information on the effects of thermal modification on bioactivity of catechins. The aim of this study was to determine the dose of thermally modified catechins, which can be used as food stabilizers at which the observed inhibition is most effective as far as the processes of initiation and progression of atherosclerosis in apoE-knockout in mice. The development of atherosclerosis was assessed on the basis of the analysis of atherosclerotic: in the aorta by *en face* method and in heart by *cross-section* method. Catechins operate most efficiently when introduced into the diet at a dosage of 0.1%. They reduce the surface of atherosclerotic lesions by 27.0% (method *en face*) and 44.2% (method of *cross-section*) with respect to the control group. Furthermore, catechins thermally modified at 0.1% and 0.2% caused a reduction of the animals' body weight gain per 1 g of the diet ingested.

**Key words:** catechins, (-) form (2S, 3R), atherosclerosis, cholesterol, apoE-knockout mice

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

Magdalena Mika, Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, Poland, e-mail: m.mika@ur.krakow.pl

*Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:*

23.02.2015

*Do cytowania – For citation:*

Mika, M., Kostogrys, R. B., Franczyk-Żarów, M., Wikiera, A. (2015). Wpływ dawki katechin modyfikowanych termicznie na hamowanie rozwoju miażdżycy u myszy apoE-knockout. *Nauka Przyr. Technol.*, 9, 3, #32. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.3.32