

УДК: 616.12-008.331.1+616.379-008.64]-056.52-092:612.018

## **ВПЛИВ ВИСОКО-ВУГЛЕВОДНОЇ ТА ВИСОКО-ЛІПІДНОЇ ДІЄТ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ ЛАНКУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА РІВЕНЬ ОКИСНО МОДИФІКОВАНИХ ПРОТЕЇНІВ І ЛІПІДІВ У ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ**

М.Р. НАГАЛЄВСЬКА\*, Т.С. ПЕТРИН, Н.О. СИБІРНА

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

E-mail: mariia.nagalievaska@lnu.edu.ua

*Досліджено вплив високо-ліпідної та високо-вуглеводної дієт, як індукторів розвитку метаболічного синдрому, на прооксидантно-антиоксидантний стан еритроцитів щурів. Окисне пошкодження клітинних компонентів оцінювали за вмістом ТБК-позитивних продуктів, а також продуктів окисної модифікації білків нейтрального та основного характеру. Антиоксидантний потенціал еритроцитів визначали за активністю супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази. Встановлено, що маніпуляції з дієтами, зокрема високо-ліпідна дієта у якій додатковим джерелом ліпідів слугувала оливкова олія та високо-вуглеводна дієта, що передбачала споживання тваринами 10%-ного розчину фруктози, призводять до розвитку оксидативного стресу в еритроцитах щурів. Показано, що 28-добова високо-ліпідна дієта не супроводжується достовірними змінами вмісту ТБК-позитивних продуктів та продуктів окисної модифікації білків, проте характеризується достовірним зниженням каталазної та глутатіонпероксидазної активностей у гемолізатах еритроцитів. Більш тривалий вплив високо-ліпідної дієти (42 доби) супроводжується зростанням вмісту ТБК-позитивних продуктів на фоні зниженої супероксиддисмутазної та каталазної активностей. При застосуванні фруктози впродовж 28 днів для індукції метаболічного синдрому не встановлено достовірних змін вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів та білків. Натомість більш тривала дія високо-вуглеводної дієти (42 доби) супроводжується зростанням вмісту ТБК-позитивних продуктів. Застосування фруктози протягом 28 днів зумовлює зниження активності супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази. Аналогічна тенденція*

*до зниження активності досліджуваних ферментів була продемонстрована і при споживанні тваринами фруктози протягом 42 днів. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що оцінка редокс-балансу еритроцитів за метаболічного синдрому є раціональним та зручним методом дослідження прооксидантно-антиоксидантного стану організму.*

**Ключові слова:** метаболічний синдром, еритроцити, антиоксидантна система.

**Вступ.** Метаболічний синдром (МетС), відповідно до його «гармонізованого» визначення, це група метаболічних факторів, що збільшує ризик розвитку серцево-судинних захворювань, цукрового діабету та пов'язаних з ними захворювань. Про наявність у пацієнта МетС може свідчити одночасна наявність принаймні трьох із наступних п'яти факторів: гіперглікемія, гіпертригліцеридемія, низький рівень холестеролу ліпопротеїнів високої щільності, гіпертонія та абдомінальне ожиріння (Restivo et al, 2021). Виникнення МетС може бути обумовлено генетичними та епігенетичними факторами, проте вирішальну роль у цьому процесі відіграють малорухливий спосіб життя, якість харчування та сну. Виникнення цього патологічного стану певною мірою контролюється мікробіотою шлунково-кишкового тракту (Monserat-Mesquida et al, 2020). Було підраховано, що більш ніж 40 % людей у віці старше 40 років мають ознаки МетС, що робить його однією з основних проблем охорони здоров'я сучасного світу (Restivo et al, 2021).

© М.Р. НАГАЛЄВСЬКА, Т.С. ПЕТРИН, Н.О. СИБІРНА, 2022

Харчування є одним з найважливіших змінних факторів, що здійснюють значний вплив на стан здоров'я людини. Надмірне споживання жирів та високий вміст глюкозо-фруктозних сиропів у повсякденному харчуванні призводять до імунометаболічних порушень, що в кінцевому результаті призводять до розвитку MetC. З огляду на ключову роль харчування у виникненні MetC, доцільним є створення модельних схем виникнення цієї патології з використанням маніпуляцій з дієтами. Найпоширенішими дієтами, які призводять до появи ключових ознак MetC є дієти з високим вмістом жирів, вуглеводів або їх комбінації. Нами було підтверджено, що надмірне споживання вуглеводів і ліпідів супроводжується порушенням толерантності до глюкози, зростанням вмісту глікозильованого гемоглобіну, триацилгліцеролів і холестеролу, а також зниженням вмісту ліпопротеїнів високої щільності (Petryn et al, 2021).

Традиційно для діагностики патологічних станів використовують ключові біомаркери, зміна вмісту яких вказує на розвиток того, чи іншого захворювання. Такими клінічними біомаркерами, які зазвичай використовуються для діагностики MetC є рівень інсуліну, глюкози, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, холестеролу та глікозильованого гемоглобіну. Оскільки у здорових людей рівень вищезгаданих біомаркерів значно варіює, непростим завданням є пов'язувати зміни їх рівня з інтенсивністю розвитку різноманітних патологічних станів. З огляду на це пошук окисно-відновних біомаркерів, які мають клінічне значення, є важливим завданням для розуміння перебігу того чи іншого патологічного стану та ефективності його терапії (Kogac et al, 2021). Одним з таких патологічних станів в основі патогенезу якого лежить не лише гіперглікемія та дисліпідемія, а також і виникнення системного окисного стресу у клітинах є MetC (Helal et al, 2011). Так було встановлено, що у пацієнтів з MetC порушене функціонування антиоксидантної системи, що проявляється у вигляді зниження концентрації вітаміну С та  $\alpha$ -токоферолу в сироватці крові, зниження активності супероксиддисмутази та підвищення рівня окиснення білків та ліпідів (Vona et al, 2019).

Зручною моделлю для дослідження редокс балансу клітин за різних патологічних станів є еритроцити. Еритроцити, як вузькоспеціалізовані клітини організму, характеризуються унікальними структурними особливостями (відсутність ядра, мітохондрій та рибосом), що робить їх дуже чутливими до оксидативних змін (Lechuga-Sancho et al, 2018). Еритроцити за фізіологічних умов здатні скавенджерувати активні форми кисню та нітрогену, що надмірно продукуються за патологічних станів. І навпаки, в умовах системного оксидативного стресу еритроцити характеризуються зміненим окисно-відновним станом і, отже, втрачають свої структурні та функціональні характеристики, та стають, у свою чергу, джерелом активних форм кисню та нітрогену сприяючи пошкодженню судин (Vona et al, 2019; Paradoroulos et al, 2021). За MetC було виявлено збільшення кількості еритроцитів з аномальною морфологією, зменшення деформації еритроцитів, збільшення в'язкості цільної крові та збільшення агрегації еритроцитів. Припускають, що такі зміни обумовлені окисненням мембранних ліпідів та білків, а також ендогенних відновлюючих речовин (Guawali et al, 2015). Таким чином, оцінка редокс балансу еритроцитів може бути використана, як біомаркер, що відіграє вирішальну роль в ускладненнях, пов'язаних з метаболічними захворюваннями.

Метою роботи було дослідити вміст окисномодифікованих білків та ліпідів, а також активність ферментів антиоксидантного захисту еритроцитів щурів за метаболічного синдрому індукованого високо-вуглеводною та високоліпідною дієтами.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводилося на білих безпородних самцях щурів віком близько 6 місяців вагою 300–400 г. Тварин утримували у віварії Львівського національного університету імені Івана Франка у чистих та сухих поліпропіленових клітках при контрольованій температурі  $25 \pm 2$  °C, відносній вологості 45–55 % та 12-годинному циклі темрява/світло. Тварини перебували на дієті рекомендованій для цього виду. Щурі акліматизувалися протягом 7 днів перед будь-якими експериментальними маніпуляціями. За 12 год до та під час експерименту тварини не мали

доступу до їжі. Постійно контролювався стан здоров'я тварин. Усі експериментальні маніпуляції були проведені з дотриманням загальних етичних принципів щодо тварин відповідно до «Загальних принципів роботи над тваринами», затверджених I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001 р.) та відповідно до настанов Директиви 2010/63/ЄС Європейського Парламенту щодо захисту тварин, що використовуються у наукових цілях, та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 26 лютого 2006 р., що було підтверджено Комітетом з етики Львівського Національного університету імені Івана Франка.

Перед початком експерименту тварин у випадковому порядку було поділено на п'ять груп:

1) контрольні тварини, які споживали стандартизований корм для лабораторних тварин (вміст жиру 6,0–6,3 % від загальної маси) (контроль);

2) тварини, які протягом 28 діб перебували на високо-ліпідній дієті (MetC + O<sub>28</sub>);

3) тварини, які протягом 42 діб перебували на високо-ліпідній дієті (MetC + O<sub>42</sub>);

4) тварини, які протягом 28 діб перебували на високо-вуглеводній дієті (MetC + F<sub>28</sub>);

5) тварини, які протягом 42 діб перебували на високо-вуглеводній дієті (MetC + F<sub>42</sub>).

Збагачена ліпідами дієта передбачала використання стандартизованого корму для лабораторних тварин з додаванням надлишкової кількості жиру (40 % маси корму). Джерелом додаткових ліпідів була оливкова олія, де вміст мононенасичених жирних кислот перевищує 65 % (Del Moral et al, 1997; Buettner et al, 2006). Тварини на раціоні, збагаченому вуглеводами, окрім стандартного корму для лабораторних тварин, споживали замість питної води 10%-ний розчин фруктози (Sánchez-Lozada et al, 2007). Для підтвердження розвитку MetC визначали концентрацію глюкози, глікозилизованого гемоглобіну та вміст триацилгліцеролів, холестеролу, ліпопротеїнів низької та високої щільності (Petryn et al, 2021).

Для отримання зразків крові наприкінці експериментального періоду тварини були позбавлені їжі протягом 12 год після чого їх знеболювали методом глибокої ефірної анестезії та виводили з експерименту. Збирали цільну кров і одразу переносили її в гепаринізовані пробірки.

Для отримання гемолізату еритроцити відокремлювали від плазми центрифугуванням при 1700 g впродовж 10 хв. Еритроцити промивали три або чотири рази ізотонічним розчином (0,9%-ний NaCl) або до отримання безбарвного супернатанту. Для отримання гемолізату до еритроцитів додавали холодну дистильовану воду у співвідношенні 1 : 3. Отриманий розчин двічі центрифугували (при 3000 g впродовж 5 хв при 4 °C) для видалення всі клітинних мембран.

Окисне пошкодження клітинних компонентів оцінювали за вмістом продуктів окисної модифікації білків та ліпідів. Вміст карбонільних груп білків визначали за реакцією взаємодії альдегідних і кетонних груп аліфатичних амінокислот із 2,4-динітрофенілгідразинном з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кето- похідні нейтрального характеру реєстрували при 370 нм, а основного характеру – при 430 нм (Meshchyshev, 1999). Результати виражали в умовних одиницях (у.о.) на грам білка. Уміст ТБК-позитивних продуктів оцінювали за реакцією утворення червоного комплексу малонового діальдегіду : тіобарбітурова кислота (ТБК) у співвідношенні 1 : 2 з максимумом поглинання при 532 нм (Temirbulatov RA, Seleznev, 1981). Результати виражали у мкмолях на грам білка.

Активність супероксиддисмутази (1.15.1.11) визначали методом, який ґрунтується на відновленні блідо-жовтого барвника нітросинього тетразолію до темно-фіолетового формазану (Csyvári et al, 1991). Результати виражали у відсотках блокування формазану. Активність каталази (1.11.1.6) розраховували за інтенсивністю забарвлення комплексу, який утворюється за взаємодії H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> з молібдатом амонію (Koroliuk et al, 1988). Каталазну активність виражали у нмолях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на хвилину на міміграм білка. Активність глутатіонпероксидази (1.11.1.9) встановлювали за швидкістю окиснення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутілу (Moin, 1986). Глутатіонпероксидазну активність виражали в мікромолях відновленого глутатіону (G-SH) на хви-

лину на міміграм білка. Концентрацію білка визначали методом Лоурі (Lowry et al, 1951).

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel. Розрахунок основних статистичних параметрів було здійснено з кількісних даних дослідження (середнє арифметичне –  $M$ , стандартне відхилення від середнього арифметичного –  $m$ ). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних вибірок даних було здійснено двофакторний дисперсійний аналіз. Різницю вважали достовірною при  $p \geq 0,95$  (рівень достовірності  $P < 0,05$ ).

#### Результати досліджень та їх обговорення.

Окисно-відновний гомеостаз клітин та їх позаклітинного середовища визначається інтенсивністю утворення прооксидантів та ефективністю їх знешкодження. На регуляторному рівні зв'язок між утворенням активних форм кисню та їх метаболізмом є двонаправленим та динамічним. Підтримка окисно-відновного стану є важливою ланкою функціонування клітин, як у нормі так і за різноманітних патологічних станів (Kogac et al, 2021). Дослідження редокс балансу клітин дозволяє розширити розуміння механізмів виникнення таких обмінних захворювань, як ожиріння, MetC та діабет.

Останні дослідження підкреслюють критичну роль оксидативного стресу у розвитку MetC (Vona et al, 2019; Monsegrat-Mesquida et al, 2020). Першою ознакою розвитку оксидативного стресу є зростання рівня перекисного окиснення ліпідів. Це обумовлено тим, що клітинна мембрана першою піддається впливу активних форм кисню та нітрогену. Окисні uszkodження ліпідів призводить до утворення пероксидів, таких як 4-гідроксиноненал та 8-ізопростан. Поруч з цим надмірне утворення активних форм кисню та нітрогену також викликає модифікації білків та амінокислотних залишків (Choromańska et al, 2020).

У тварин, які перебували на високо-ліпідній дієті впродовж 28 днів не було виявлено достовірних змін вмісту ТБК-позитивних продуктів та продуктів окисної модифікації білків. Натомість за надмірного споживання ліпідів впродовж 42 діб продемонстровано тенденцію до зростання вмісту ТБК-позитивних про-

дуктів (на 11 %, щодо контролю) (рис. 1). Аналогічні результати, щодо відсутності впливу високо-ліпідної дієти на вміст ТБК-позитивних продуктів було продемонстровано на мишах, що споживали високо-ліпідну дієту впродовж 8 тижнів. Цими ж дослідниками було встановлено, що надмірне споживання ліпідів зумовлює зростання маркеру оксидативного стресу – фосфатидилхолін гідропероксиду (Ito et al, 2016). Натомість, іншими дослідженнями встановлено зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів за високо-ліпідної дієти на якій тварини перебували впродовж 16 тижнів (Farrokhsfall et al, 2014). Таким чином, відсутність достовірних змін вмісту ТБК-позитивних продуктів за наших умов експерименту може бути пов'язана з недостатнім періодом впливу індукуючого чинника, яким виступає надмірне споживання ліпідів.

На фоні помірного зростання вмісту окисномодифікованих ліпідів, на 42-гу добу експерименту нами було встановлено достовірне зростання продуктів окисної модифікації білків, як основного так і нейтрального характеру, відповідно на 44 та 39 %, щодо контрольних значень (рис. 2).

Попередніми дослідженнями нами було підтверджено, що споживання лабораторними тваринами високо-ліпідної дієти зумовлює виникнення дисліпідемії та ознак ожиріння (Petryn et al, 2021). Встановлено, що зміна співвідношення ліпідів може розглядатися, як фактор, що сприяє розвитку оксидативного стресу. Зростання рівня активних форм кисню у цьому випадку може бути обумовлено вивільненням ряду цитокінів, особливо фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). За умов дисліпідемії додатковим чинником, що може зумовлювати розбалансування антиоксидантної системи є зростання біодоступності вільних жирних кислот (Noeman et al, 2011). Крім того, в гіпертрофованих адипоцитах, перевантажених триацилгліцеридами, активується мембранна NAD(P)-оксидаза і внаслідок цього посилюється продукція активних форм кисню (Houstis et al, 2006).

Таким чином, високо-ліпідна дієта призводить до окисної модифікації, як ліпідів та білків. При цьому варто зазначити, що більш деструктивний вплив дієти було встановлено,

щодо білків. Використання визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків, як маркера пошкодження біомолекул має певні переваги у порівнянні з іншими маркерами, що обумовлено їх відносно раннім утворенням, більшою стабільністю та надійністю, а також їх тривалим терміном життя (Noeman et al, 2011).

Застосування фруктози впродовж 28 діб для індукції MetC не супроводжується достовірними змінами вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів та білків (рис. 1 та 2). Натомість більш тривала дія високо-вуглеводної дієти (42 доби) супроводжується зростанням вмісту ТБК-позитивних продуктів на 62 %, щодо тварин, що споживали звичайний корм для тварин (рис. 1). Поруч зі зростанням вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів було встановлено зростання продуктів окисної модифікації білків нейтрального характеру на 16 %, щодо контрольних значень.

Фруктоза та продукти її метаболічного окиснення, такі як метилгліюксаль, неферментативно реагують з нуклеофільними субстратами, серед яких білки. У результаті такої взаємодії утворюються аддукти, які називаються кінцевими продуктами глікації (AGEs) (Maessen et al, 2015). AGEs взаємодіючи зі своїм специфічними рецепторами (RAGE) на поверхні клітин, ініціюючи сигнальний каскад, який активує ядерний фактор транскрипції-каппа В (NF-κB), що в свою чергу призводить до збільшення вивільнення таких прозапальних цитокінів, як TNF-α. Ця вісь AGE-RAGE, активуючи NAD(P)H-оксидазу та/або за допомогою інших аналогічних механізмів, також індукуює утворення активних форм кисню, які посилюють оксидативне пошкодження клітин (Cannizzaro et al, 2017).

Попередніми нашими дослідженнями було підтверджено розвиток гіперглікемії та дисліпідемії за умов, як високо-ліпідної так і високо-вуглеводної дієт (Petrun et al, 2021). Надмірне накопичення глюкози активує всі шляхи її метаболізму, що призводить до накопичення NADH і FADH<sub>2</sub>. Це призводить на надмірної активації комплексів ланцюга транспорту електронів і збільшує ступінь їх відновлення. Згодом електрохімічний потенціал на внутрішній мембрані мітохондрій викликає витік електронів у комплексах I, II та III, що призводить

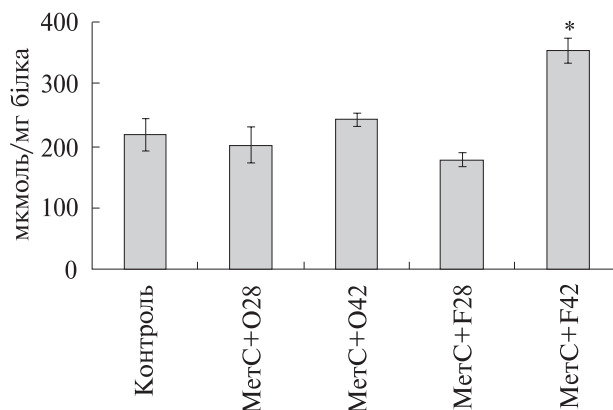


Рис. 1. Вміст ТБК-позитивних продуктів у нормі, за ліпід-індукованого та вуглевод-індукованого метаболічного синдрому. Різниця вірогідна порівняно з контролем, P < 0,05

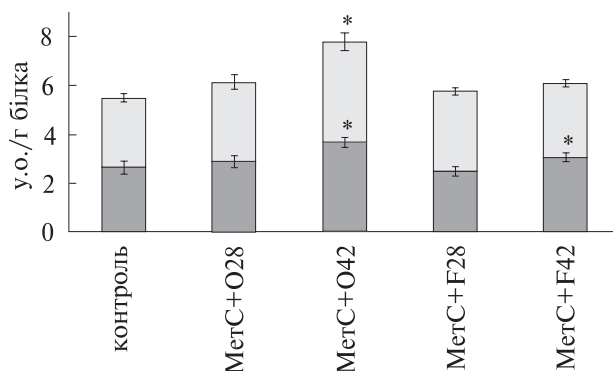


Рис. 2. Вміст продуктів окисної модифікації білків у нормі, за ліпід-індукованого та вуглевод-індукованого метаболічного синдрому. Різниця вірогідна порівняно з контролем, P < 0,05

до утворення супероксид аніон радикалу, пероксиду гідрогену та гідроксильного радикалу. Підвищені рівні NADH, а також активних форм кисню та нітрогену інактивують гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназу, що призводить до блокування гліколітичного шляху та накопичення гліцеральдегід-3-фосфату, що є основним попередником синтезу метилгліюксалу. Накопичення гліколітичних метаболітів, у свою чергу, активує альтернативні шляхи метаболізму глюкози (поліольний та гексозаміновий), додатково збільшуючи утворення активних форм кисню та нітрогену (Choi et al, 2011; Korac et al, 2021).

Дисліпідемія та ожиріння за MetC супроводжуються зростанням концентрації циркулюючих вільних жирних кислот, що утворюють ектопічні ліпідні відкладення та викликають ліпотоксичність (Ravussin and Smith, 2002). Накопичення вільних жирних кислот призводить до зміни співвідношення ацетил CoA/CoA та NADH/NAD<sup>+</sup> у мітохондріях, що, у свою чергу, інактивує регуляторні ферменти гліколізу. У сукупності ці події призводять до накопичення глюкозо-6-фосфату, що інгібує активність гексокінази II, тим самим збільшуючи внутрішньоклітинну концентрацію глюкози. Циркулюючі жирні кислоти спочатку естерифікуються та накопичуються у вигляді триацилгліцеролів, і лише після цього можуть окиснюватися (Unger and Orsi, 2000). У випадку коли цей пул внутрішньоклітинного жиру в м'язах та інших органах (печінці або підшлунковій залозі), перевищує критичні рівні виникає ліпотоксичність. При ліпотоксичності жирні кислоти та інші ліпідні метаболіти, такі як діацилгліцерол, церамід, довголанцюгові ацил-коензим А, альдегіди ліпідів індукують посилення оксидативного стресу. Діацилгліцероли діють як прямі активатори протеїнкінази С та інших чутливих до стресу серинових/треонінових кіназ, які порушують фосфорилування тирозину субстрату інсулінового рецептора та відповідно інсулінове сигналювання (Evans et al, 2002). Протеїнкіназа С та інші стрес-активовані протеїнкінази (SAPK) індукують надпродукцію оксиду нітрогену, що призводить до розвитку нітративного стресу (Kogac et al, 2021). Варто зазначити, що одна з основних ознак ліпотоксичності це накопичення реакційноздатних ліпідних альдегідів, включаючи 4-гідроксиноненал та малоновий діальдегід та подальше карбонілювання білків (Nauck and Bernlohr, 2016; Kogac et al, 2021).

Невід'ємною ланкою редокс-балансу клітин є функціонування механізмів антиоксидантного захисту. Механізми захисту організму людини від оксидативного стресу складні і включають клітинні та позаклітинні антиоксидантні системи, які регулюються на багатьох рівнях. Цілий ряд ферментів (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза, параксоназа, глутатіонредуктаза), а також нефер-

ментні антиоксидантні сполуки (хелатори металів, низькомолекулярні антиоксиданти) беруть участь в антиоксидантному захисті організму (Noeman et al, 2011).

Механізм захисту клітин від активних форм кисню реалізується в кілька послідовних етапів. На першому етапі фермент супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію супероксид аніон радикалу в кисень і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. На другому етапі каталаза та глутатіонпероксидаза незалежно один від одного перетворюють H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у воду. Будь-яке збільшення каталітичної активності супероксиддисмутази призводить до утворення надлишку H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, який необхідно ефективно нейтралізувати за участю каталази або глутатіонпероксидази. В іншому випадку H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> реагує з супероксид аніон радикалом утворюючи у реакції Хабера-Вайса гідроксильні радикали, які є ще більш цитотоксичними (Vávrová et al, 2013).

При індукції MetC надмірним споживанням оливкової олії було встановлено, що 28 денний курс споживання жирів супроводжується достовірним зниженням каталазної та глутатіонпероксидазної активності, відповідно на 47 та 36 %, щодо тварин, які перебували на стандартному кормі. Одночасно встановлено тенденцію до зниження (на 25 %, щодо контролю) супероксиддисмутазної активності. За більш тривалого споживання високо-ліпідної дієти еритроцити тварин характеризувалися зниженою супероксиддисмутазною та каталазною активностями, відповідно на 36 та 46 %, щодо значень контролю. За 42-ох денного споживання надмірної кількості жирів встановлено тенденцію до зниження глутатіонпероксидазної активності на 12 %, щодо контролю (рис. 3).

Отримані нами результати узгоджуються з дослідженнями проведеними Choi та колегами (Choi and Seo, 2013), в яких було встановлено зниження активності ферментів антиоксидантного захисту за високо-ліпідної дієти. Отримані результати свідчать про те, що дієта з високим вмістом жиру впливає на рівень оксидативного стресу і може вважатися підвищеним ризиком розвитку захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом. Накопичення жирової тканини в організмі призводить до підвищення системного оксидативного стресу в результаті посиленого продукування активних форм

оксигену і викликає аномальну експресію адипоцитокінів, що в кінцевому результаті призводить до розвитку інсулінорезистентності (Furukawa et al, 2004). Накопичення жиру може також призводити до посилення оксидативного стресу шляхом посилення перекисного окиснення ліпідів.

Застосування фруктози для індукції MetC призводить до значного зниження активності окремих ферментів антиоксидантного захисту еритроцитів. Зокрема встановлено, що її застосування впродовж 28 діб зумовлює зниження активності супероксиддисмутази на 50 %, каталази на 37 % та глутатіонпероксидази на 30 %, щодо контролю. Аналогічні зміни активності досліджуваних ферментів були продемонстровані при споживанні тваринами фруктози протягом 42 діб. Показано тенденцію до зниження супероксиддисмутази активності на 16 %, каталази активності на 58 % та глутатіонпероксидази активності на 26 % (рис. 4). Отримані нами результати узгоджуються з іншими дослідженнями, якими також було підтверджено значне збільшення перекисного окиснення ліпідів та зниження активності антиоксидантних ферментів клітин печінки у щурів (Nandhini et al, 2005; Reddy et al, 2009). Індукована фруктозою гіперглікемія є одним із ключових факторів збільшення рівня активних форм кисню, перекисного окиснення ліпідів, що у сукупності викликає виснаження антиоксидантного захисту клітин (Reddy et al, 2009). Збільшення катаболізму фруктози спричиняє зниження загального рівня глутатіону та пригнічення активності ферментів антиоксидантного захисту (Suwannaphet et al, 2010). Крім цього, прооксидантний ефект фруктози може бути обумовлений здатністю харчової фруктози взаємодіяти з іонами купруму та знижувати їх вміст, що в свою чергу закономірно призводить до зниження активності супероксиддисмутази (Busserolles et al, 2002).

Зниження активності ферментів антиоксидантного захисту за умов дієт-індукованого MetC може бути обумовлено комбінацією декількох механізмів. Посилене перекисне окиснення ліпідів призводить до інактивації ферментів шляхом утворення перехресних зшивок з малоновим діальдегідом. Такі модифікації призводять до збільшення накопичення супер-

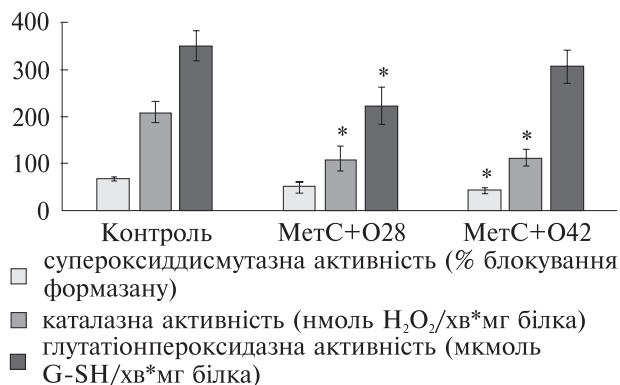


Рис. 3. Активність окремих ензимів системи антиоксидантного захисту в клітинах крові в нормі та за ліпід-індукованого метаболічного синдрому. Різниця вірогідна порівняно з контролем, P < 0,05

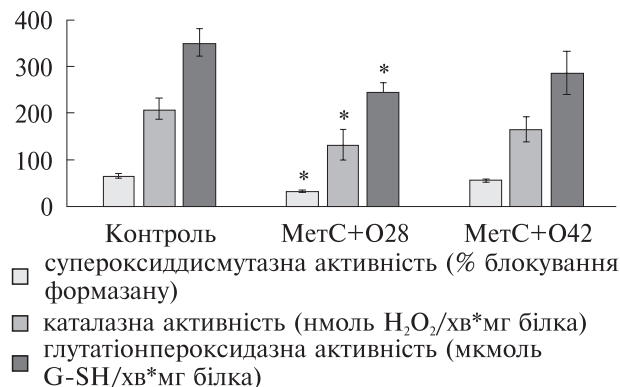


Рис. 4. Активність окремих ензимів системи антиоксидантного захисту в клітинах крові в нормі та за вуглевод-індукованого метаболічного синдрому. Різниця вірогідна порівняно з контролем, P < 0,05

оксидного та гідроксильного радикалів, що може додатково стимулювати перекисне окиснення ліпідів. Кореляційним дослідженням було продемонстровано негативну кореляцію між рівнями окисної модифікації ліпідів/білків та активністю ферментів антиоксидантного захисту клітин печінки, нирок та серцевого м'яза. Також, зниження активності ферментів антиоксидантного захисту може бути зумовлено швидким споживанням та вичерпанням запасів цих ферментів у боротьбі з вільними радикалами, що утворюються в надмірній кількості за дієт-індукованого MetC (Noeman et al, 2011).

Додатковим механізмом зниження активності таких антиоксидантних ферментів, як супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та

гем-оксидаза за високо-вуглеводної та високо-ліпідної дієти може бути активація NAD(P)H-оксидази, ензиму що генерує активні форми кисню (Roberts et al, 2006).

Таким чином, нами встановлено, що маніпуляції з дієтами, зокрема високо-ліпідна дієта у якій додатковим джерелом ліпідів слугувала оливкова олія та високо-вуглеводна дієта, що передбачала споживання тваринами 10%-ного розчину фруктози, призводять до розвитку оксидативного стресу в еритроцитах щурів. Зокрема, встановлено зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів та карбонільних груп білків нейтрального та основного характеру. Зростання інтенсивності окисної модифікації ліпідів та білків супроводжується значним зниженням активності окремих ферментів антиоксидантного захисту клітин. Варто зазначити, що триваліший вплив індукуючих чинників зумовлює більш виражені зміни досліджуваних параметрів. Оцінка редокс-балансу еритроцитів за MetC є раціональним та зручним методом дослідження прооксидантно-антиоксидантного стану організму. Поруч з дослідженням таких ключових діагностичних маркерів, як рівень глюкози та ліпідний профіль, визначення таких показників, як вміст ТБК-позитивних продуктів, карбонільних груп білків, а також активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази є доцільним методом дослідження ефективності препаратів, що потенційно можуть застосовуватися для терапії метаболічного синдрому.

**Дотримання етичних норм.** Усі експериментальні маніпуляції були проведені з дотриманням загальних етичних принципів щодо тварин відповідно до «Загальних принципів роботи над тваринами», затверджених І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001 р.) та відповідно до настанов Директиви 2010/63/ЄС Європейського Парламенту щодо захисту тварин, що використовуються у наукових цілях, та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 26 лютого 2006 р., що було підтверджено Комітетом з етики Львівського Національного університету ім. І. Франка.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Це дослідження не отримувало

будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

#### INFLUENCE OF HIGH-CARBOHYDRATE AND HIGH-LIPID DIET ON THE ENZYMATIC LINK OF ANTIOXIDANT PROTECTION AND THE LEVEL OF OXIDATIVELY MODIFIED PROTEINS AND LIPIDS IN RAT ERYTHROCYTES

*M.R. Nagalievskaya, T.S. Petryn, N.O. Sybirna*

Ivan Franko National University of Lviv,  
Hrushevskiy St., 4, Lviv 79005, Ukraine  
E-mail: mariia.nagalievskaya@lnu.edu.ua

The influence of high-lipid and high-carbohydrate diet, as inducers of the development of metabolic syndrome on the prooxidant-antioxidant state of rat erythrocytes have been studied. Oxidative damage of cellular components was evaluated by the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as well as products of oxidative modification of proteins of neutral and basic nature. The antioxidant potential of erythrocytes was determined by the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. Manipulations with diets, especially high-lipid diet in which an additional source of lipids was olive oil and high-carbohydrate diet, which involved the consumption of animals 10 % fructose solution, promoting the development of oxidative stress in rats' erythrocytes. It has been shown that a 28-day high-lipid diet does not support significant variables in TBARS and oxidized protein modification products, but demonstrates significant reduced catalase and glutathione peroxidase activity in hemolytic erythrocytes. The longer duration of exposure to the high-lipid diet (42 days) was accompanied by an increase in the content of TBARS against the background of reduced superoxide dismutase and catalase activity. When using fructose for 28 days for the induction of metabolic syndrome, no significant changes in the content of products of oxidative modification of lipids and protein were shown. Instead, a longer effect of a high-carbohydrate diet (42 days) is accompanied by an increase in the content of TBARS. The use of fructose for 28 days causes a decrease in the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. A similar tendency to decrease the activity of the studied enzymes was demonstrated when animals consumed fructose for 42 days. The obtained results allow us to conclude that the assessment of redox balance of erythrocytes in metabolic syndrome is a rational and convenient method of studying the prooxidant-antioxidant state of the body.



СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M et al. (2006) Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36:485–501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
- Busserolles J, Zimowska W, Rock E et al. (2002) Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci* 71:1303–1312. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01846-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01846-5)
- Cannizzaro L, Rossoni G, Savi F et al. (2017) Regulatory landscape of AGE-RAGE-oxidative stress axis and its modulation by PPAR $\gamma$  activation in high fructose diet-induced metabolic syndrome. *Nutr Metab* 14:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0149-z>
- Choi HN, Park YH, Kim JH et al. (2011) Renoprotective and antioxidant effects of *Saururus chinensis* Baill in rats fed a high-fructose diet. *Nutr Res Pract* 5:365–369. <https://doi.org/10.4162/nrp.2011.5.4.365>
- Choi SK, Seo JS. (2013) Lycopene supplementation suppresses oxidative stress induced by a high fat diet in gerbils. *Nutr Res Pract* 7:26–33. <https://doi.org/10.4162/nrp.2013.7.1.26>
- Choromańska B, Myśliwiec P, Łuba M et al. (2020) A Longitudinal Study of the Antioxidant Barrier and Oxidative Stress in Morbidly Obese Patients after Bariatric Surgery. Does the Metabolic Syndrome Affect the Redox Homeostasis of Obese People? *J Clin Med* 9:976. <https://doi.org/10.3390/jcm9040976>
- Csyvári S, Andyal T, Strenger J. (1991) Determination of the antioxidant properties of the blood and their diagnostic significance in the elderly. *Lab Delo* 10:9–13. Russian.
- Del Moral ML, Esteban FJ, Torres MI et al. (1997) High-fat sunflower and olive oil diets affect serum lipid levels in steatotic rat liver differently. *J Nutr Sci Vitaminol* 43:155–160. <https://doi.org/10.3177/jnsv.43.155>
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599–622. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0039>
- Farrokhfall K, Khoshbaten A, Zahediasl S et al. (2014) Improved islet function is associated with anti-inflammatory, antioxidant and hypoglycemic potential of cinnamaldehyde on metabolic syndrome induced by high tail fat in rats. *J Funct Foods* 10:397–406. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.014>
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>
- Hauck AK, Bernlohr DA. (2016) Thematic review series: Lipotoxicity: Many roads to cell dysfunction and cell death: Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* 57:1976–1986. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066597>
- Helal O, Defoort C, Robert S et al. (2011) Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: Relationship with oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:665–671. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.01.004>
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944–948. <https://doi.org/10.1038/nature04634>
- Ito J, Nakagawa K, Kato S et al. (2016) The combination of maternal and offspring high-fat diets causes marked oxidative stress and development of metabolic syndrome in mouse offspring. *Life Sci* 151:70–75. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.089>
- Korac B, Kalezic A, Pekovic-Vaughan V et al. (2021) Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biol* 42:101887. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101887>
- Koroliuk M, Ivanova L, Mańorova I, Tokarev V. (1988) A method of determining catalase activity. *Lab Delo* 1:16–9. (Russian)
- Lechuga-Sancho AM, Gallego-Andujar D, Ruiz-Ocaca P et al. (2018) Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PLoS One* 13:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191547>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Maessen DEM, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG. (2015) The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci* 128:839–861. <https://doi.org/10.1042/CS20140683>
- Meshchysheva I. (1999) The determining method of proteins oxidative modification. *Bukov Med Visnyk* 1:196–205
- Moin V. (1986) A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab Delo* 12:724–727. (Russian)
- Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Capu X et al. (2020) Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants* 9:1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox9030236>
- Nandhini ATA, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. (2005) Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med J* 46:82–87
- Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. (2011) Bio-

- chemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr* 3:1–8. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>
- Papadopoulos C, Tentes I, Anagnostopoulos K. (2021) Erythrocytes Contribute to the Immunometabolic Cross-Talk. *Immunometabolism* 3:1–7. <https://doi.org/10.20900/immunometab20210015>
- Petryn TS, Nagalievskaya MR, Sybirna NO. (2021) Comparison of high-fat and high-carbohydrate diets for obtaining an experimental model of metabolic syndrome. *Stud Biol* 15:3–14. <https://doi.org/10.30970/sbi.1501.642>
- Ravussin E, Smith SR. (2002) Increased Fat Intake, Impaired Fat Oxidation, and Failure of Fat Cell Proliferation Result in Ectopic Fat Storage, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes. *Ann NEW YORK Acad Sci* 967:363–378. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04292.x>
- Reddy SS, Ramatholisamma P, Karuna R, Saralakumari D. (2009) Preventive effect of *Tinospora cordifolia* against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in male Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 47:2224–2229. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.008>
- Restivo I, Attanzio A, Tesoriere L, Allegra M. (2021) Suicidal erythrocyte death in metabolic syndrome. *Antioxidants* 10:1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox10020154>
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK et al. (2006) Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 55:928–934. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.02.022>
- Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A et al. (2007) Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol – Ren Physiol* 292:423–429. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00124.2006>
- Suwannaphet W, Meeprom A, Yibchok-anun S, Adisakwattana S. (2010) Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 48:1853–1857. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.021>
- Temirbulatov, R. A., Seleznev YI. (1981) A method for increasing intensity of free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value. *Lab Delo* 4:209–211.
- Unger RH, Orci L. (2000) Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes* 24:S28–S32. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801498>
- Vávrová L, Kodydková J, Zeman M et al. (2013) Altered activities of antioxidant enzymes in patients with metabolic syndrome. *Obes Facts* 6:39–47. <https://doi.org/10.1159/000348569>
- Vona R, Gambardella L, Cittadini C et al. (2019) Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019:1–19. <https://doi.org/10.1155/2019/8267234>

Надійшла в редакцію 20.08.21  
Після доопрацювання 30.08.21  
Прийнята до друку 18.01.22