

Стан глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи крові при застосуванні порошку насіння фенугреку тварин з експериментальним ожирінням

В.В. Конопельнюк, Л.І. Кот, Т.В. Коваль, Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; e-mail: tkhilko@gmail.com

*Досліджено вміст відновленого глутатіону (GSH) та активність глутатіонзалежних ферментів: глутатіонпероксидази (GP) і глутатіон-S-трансферази (GT) у сироватці крові щурів при введенні в дієту насіння *Trigonella foenum graecum* L. на фоні розвитку експериментального ожиріння. Встановлено, що розвиток ожиріння у щурів супроводжувався порушенням гомеостазу в глутатіонзалежній системі сироватки крові. У тварин, які перебували на висококалорійній дієті, разом зі зниженням (у 1,2 раза) вмісту GSH зменшувалась активність GP (у 1,7 раза) та зростала (у 1,7 раза) активність GT порівняно з контролем через 14 тиж. Доповнення висококалорійної дієти 2%-ми дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum* L. знижувало приріст маси тіла щурів на 21% та здійснювало позитивний модулювальний вплив на вміст GSH і активність GP, GT у тварин з експериментальним ожирінням*

*Ключові слова: дієтіндуковане ожиріння; відновлений глутатіон; глутатіонпероксидаза; глутатіон-трансфераза; дрібнодисперсний порошок насіння *Trigonella foenum graecum* L.*

ВСТУП

Нині ожиріння є однією з пріоритетних і соціально значущих проблем сучасної науки та медицини. Загальновизнано, що зростання частоти ожиріння серед населення розвинених країн набуває загрозливих темпів, що порівнюють з епідемією [1]. Це зумовлено малорухливим способом життя, характерним для сучасного суспільства, переїданням, вживанням шкідливих для організму продуктів, постійними психологічними стресами. Надлишкова маса тіла часто асоціюється з розвитком серцево-судинних захворювань, призводить до порушень вуглеводного, ліпідного, пуринового обмінів та гемостазу, цукрового діабету II типу, а отже, в результаті до зниження тривалості життя [2,3].

Незважаючи на наявність багатьох досліджень, що стосуються терапії хворих із ожирінням,

результати лікування не завжди задовільні. Різноманітні низькокалорійні дієти, які часто супроводжуються порушеннями в обміні речовин, а також побічні ефекти та ускладнення, в тому числі алергічні реакції, що зумовлені медикаментозною терапією, спонукають до розробки більш ефективних схем лікування метаболічних порушень. У сучасній медичній практиці все частіше для лікування ожиріння застосовують препарати рослинного походження, що містять сполуки з різною біологічною активністю, які мають здійснювати на організм людини комплексний фізіологічний вплив, добре сприймаються та не викликають побічних реакцій. Особливу увагу приділяють вмісту у сировині антиоксидантів, що здатні попереджати вільнорадикальне окиснення біологічних структур організму, таким чином запобігаючи розвитку патологічних змін.

© В.В. Конопельнюк, Л.І. Кот, Т.В. Коваль, Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

Patil і Jain [4] показали ефективність складових *Trigonella foenum graecum* L. у лікуванні цілого ряду патологічних станів. Насіння рослини містить велику кількість біологічно активних речовин, зокрема вуглеводи (45-60%), ліпіди (6-10%), білки (20-30%), стероїдні сапоніни (5-6%), флавоноїди, алкалоїди (2-3%), ефірні олії, вітаміни, мікроелементи тощо [5]. Завдяки своєму унікальному біохімічному складу цій рослині притаманні протизапальні, антидіабетичні, гіпохолестеринемічні, імуномодулювальні та антиоксидантні ефекти [6]. Тому перспектива подальших досліджень *Trigonella foenum graecum* L. як потенційного засобу для корекції метаболічних порушень за умов ожиріння є достатньо обґрунтованою.

Важливе значення у розвитку патологічних змін при ожирінні має надмірна активація вільнорадикальних процесів, і як наслідок, порушення про- та антиоксидантної рівноваги і розвиток оксидативного стресу [7]. Система глутатіону є однією із активних складових антиоксидантної системи захисту організму, яка відіграє значну роль у пригніченні патологічного процесу, її виснаження може призводити до виникнення серйозних цитотоксичних і деструктивних ушкоджень [8]. Вивчення змін у глутатіоновій системі важливе для пошуку нових фармакологічних засобів, зокрема природного походження, які здатні корегувати стан окисного стресу.

Метою нашої роботи було оцінити вміст відновленого глутатіону (GSH), активності глутатіонзалежних ензимів: глутатіон-S-трансферази (GT) і глутатіонпероксидази (GP) у сироватці крові щурів як за умов експериментальної моделі ожиріння, так і при доповненні висококалорійної дієти 2 %-м дрібнодисперсним порошком насіння *Trigonella foenum graecum* L.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях з початковою масою 150–170 г,

яких утримували за стандартних умов віварію, з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Впродовж першого тижня тварини перебували на стандартному раціоні харчування з вільним доступом до води. На 8-му добу їх розподілили на 3 групи по 10 у кожній. До 1-ї групи ввійшли контрольні тварини, які отримували стандартний корм віварію та воду *ad libitum*. Тварини 2-ї і 3-ї груп з модельованим експериментальним ожирінням протягом 14 тиж перебували на висококалорійній дієті, яка складалася зі стандартного корму: свинячого жиру (10%), курячих яєць (10%), цукру (19%), арахісу (5%), сухого молока (5%), рослинної олії (1%) [9]. Щури 3-ї групи отримували 14 тиж висококалорійну дієту, яка додатково містила 2% дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum* L., який був наданий професором Ш. Макаєм з Університету імені Святого Штефана.

Вміст GSH в сироватці крові щурів визначали спектрофлуориметричним методом з використанням ортофталевого альдегіду, в результаті реакції якого з GSH утворюються високофлуоресцентні продукти, які активуються при 350 нм, і мають чітко виражений пік при 420 нм [10, 11]. Активність GP визначали за методом Разиграєва з використанням пероксиду водню та 5,5 – дитіобіс (2-нітробензойної) кислоти [12]. Активність GT оцінювали за швидкістю утворення кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ), який характеризується максимумом поглинання при 346 нм [13]. Ферментативну активність перераховували на 1 мг білка, вміст якого визначали за методом Бредфорд.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики із застосуванням One-Way ANOVA і t-test стандартного пакету прикладних програм Statistica 8.0. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано тест Ша-

піро-Вілка. Порівняння вибірок проводили за допомогою критерію *t* Стьюдента. Експериментальні результати представляли у вигляді $M \pm m$ для кожної експериментальної групи. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нині актуальним є пошук сполук природного походження, які могли б корегувати метаболічні порушення за умов розвитку ожиріння. Насінню *Trigonella foenum graecum* L. завдяки наявності у своєму складі широкого спектра біологічно активних сполук (галактотамани, стероїдні сапоніни, 4-гідроксиізолейцин, флавоноїди тощо), властиві багато терапевтичних ефектів. Вживання насіння рослини може сприяти зниженню вмісту холестерину в плазмі крові та зниженню його синтезу в печінці.

На рис. 1 відображено динаміку зростання маси тіла щурів експериментальних груп протягом 14 тиж. Під час досліджень було встановлено, що після споживання висококалорійної дієти кінцева маса ($416,3 \pm 9,511$ г) тіла щурів була значно вищою порівняно з початковою масою ($179,9 \pm 18,076$ г) тварин 2-ї групи. Таким чином, протягом розвитку

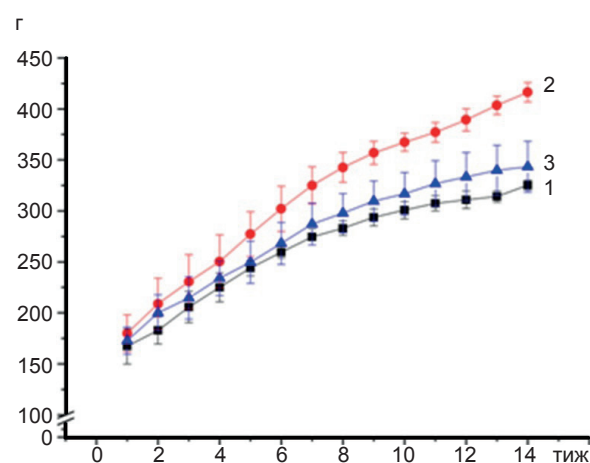


Рис.1. Маса тіла щурів в нормі (1), при дієтиндукованому ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum* L. на фоні висококалорійної дієти (3)

ожиріння зареєстровано збільшення маси тіла тварин у 2,3 раза.

У 3-й групі щурів, що споживали висококалорійну дієту, доповнену 2% порошку насіння фенугреку, не спостерігалось надмірного зростання маси тіла тварин. Порівняно з 2-ю групою цей показник був меншим на 21%. Отже, наші результати свідчать, що активні сполуки *Trigonella foenum graecum* L. можуть впливати на засвоєння поживних речовин, знижують приріст маси тіла щурів. Іншими авторами також отримані дані подібного характеру. Вони вважають, що застосування *Trigonella foenum graecum* L. інгібує формування нових диференційованих «малих» жирових клітин з преадипоцитів та накопичення ліпідів, що запобігає збільшенню маси тіла, викликаному споживанням їжі з високим вмістом жирів [14].

Одним з критеріїв розвитку ожиріння є ефективність годування тварин. Це відношення набраної маси (г) до кількості спожитого корму (г). Згідно з отриманими результатами спостерігалось зростання цього показника в групі тварин, які споживали висококалорійну дієту. У них ефективність годування була більшою на 34,5% порівняно з щурами, що споживали стандартний корм (контрольна група). А ефективність годування щурів, що разом з висококалорійним кормом отримували 2% дрібнодисперсного порошку насіння фенугреку, є такою ж самою, як і в контрольній групі щурів. У щурів 3-ї групи цей показник був меншим на 26 % порівняно з тваринами 2-ї групи. Можна передбачати, що збільшення показника ефективності годування у щурів, які отримували висококалорійну дієту, пов'язане з висококалорійним складом корму, а зменшення у щурів 3-ї групи – з гіполіпідемічними властивостями складових порошку насіння *Trigonella foenum graecum* L.

Відомо, що насіння *Trigonella foenum graecum* L. може мати дозозалежний ефект на модуляцію активності ферментів антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази, каталази та GT [16]. Великого значення

набуває дослідження вмісту GSH – основного модулятора ферментативної редокс-системи глутатіону, а також активності глутатіонзалежних ензимів: GT та GP, що забезпечують детоксикацію перекисів, органічних гідроперекисів, інактивацію вільних радикалів та таким чином захищають організм від окисного пошкодження, що відбувається при різних патологічних станах, в тому числі і ожирінні. Причиною виникнення оксидативного стресу є дисбаланс між інтенсивною продукцією вільних радикалів і депресією антиоксидантних систем клітини. Накопичення в клітинах вільних радикалів може призводити до окисної модифікації молекул, пошкодження клітинних структур і, як наслідок, клітинної загибелі. За таких умов важливою ланкою в процесах інактивації вільних радикалів є система глутатіону [16].

Найбільш важливий компонент глутатіонзалежної антиоксидантної системи GSH, який швидко мобілізується в разі підвищеного вмісту активних форм кисню та відновлює їх у реакціях з утворенням окисненого глутатіону (GSSG), у такий спосіб забезпечує резистентність клітин до ПОЛ, вільних радикалів, алкілювання білків, і попереджує пошкодження структури ДНК. Враховуючи безпосередню участь глутатіону у багатьох процесах життєдіяльності клітини, в тому числі диференціації, проліферації, апоптозу, порушення його гомеостазу може свідчити про розвиток патологічних змін на фоні розвитку ожиріння [8, 17].

Таким чином, для оцінки загального стану антиоксидантної системи організму за умов розвитку дієтіндукованого ожиріння нами було визначено вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів. Після 14 тиж вживання висококалорійної дієти спостерігали зниження цього показника у 1,2 раза відносно контролю, що, ймовірно, свідчило про його використання в реакціях знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на фоні довготривалого висококалорійного навантаження (рис.2).

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших досліджень [18], в яких показано зниження вмісту GSH у сироватці крові та гомогенатах тканин печінки, серця, та аорти щурів, які довготривало споживали висококалорійну дієту. Як свідчать результати наших досліджень, споживання 2% дрібнодисперсного порошку *Trigonella foenum graecum L.* разом з висококалорійним харчовим раціоном протягом 14 тиж призводило до підвищення вмісту GSH в сироватці крові щурів (див. рис.2).

Одночасно зі змінами вмісту GSH за умов розвитку ожиріння змінювалась активність глутатіонзалежних ферментів. Так, разом зі зниженням вмісту GSH зменшується активність GP в 1,7 раза у сироватці крові тварин, що знаходились на висококалорійній дієті, порівняно з контролем (рис. 3). Отже, вміст GSH та активність GP зменшувалися при дегенеративних змінах тканин у досліджуваних тварин. Таке пригнічення ферментативної активності може бути пов'язано з тим, що функціонування GP залежить від вмісту внутрішньоклітинного GSH, який відіграє роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, які окиснюються у процесі

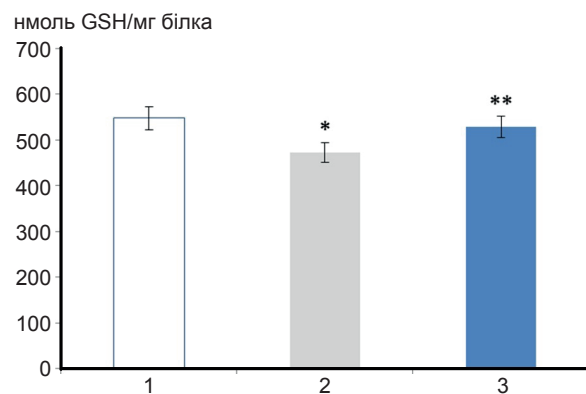


Рис.2. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів в нормі (1), при дієтіндукованому ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum L.* на фоні висококалорійної дієти (3).

* P < 0,05 щодо значень відносно контролю, ** P < 0,05 щодо значень при дієтіндукованому ожирінні

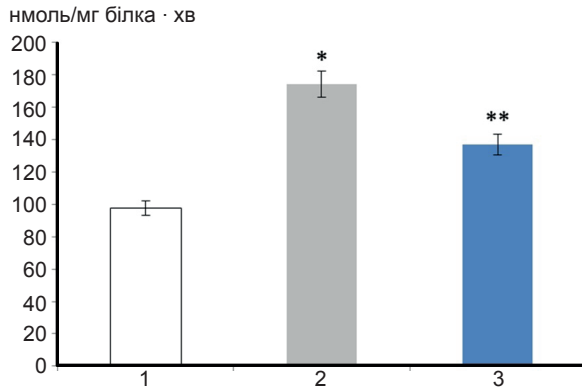


Рис.3. Активність глутатіонтрансферази в сироватці крові щурів в нормі (1), при дієтичному ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum L.* на фоні висококалорійної дієти (3).

* $P < 0,05$ щодо значень відносно контролю,

** $P < 0,05$ щодо значень при дієтичному ожирінні

глутатіонпероксидазної реакції [18]. Також не виключено, що зниження активності GP за умов експериментального ожиріння протягом 14 тиж може бути зумовлено не тільки вичерпанням доступного пулу GSH, а й накопиченням продуктів ліпопероксидації.

На відміну від GP активність GT підвищувалась у 1,7 раза за умов споживання висококалорійної дієти порівняно з контролем (рис. 4). Активацію цього показника у сироватці крові щурів з експериментальним ожирінням можна вважати компенсаторною реакцією

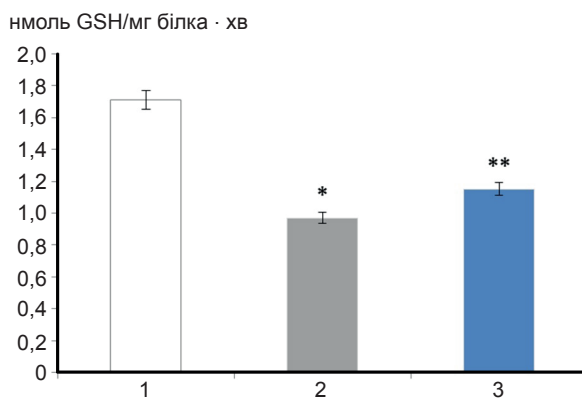


Рис.4. Активність глутатіонпероксидази в сироватці крові щурів в нормі (1), при дієтичному ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum L.* на фоні висококалорійної дієти (3).

* $P < 0,05$ щодо значень відносно контролю, ** $P < 0,05$ щодо значень при дієтичному ожирінні

при зниженні активності GP за умов тривалого споживання висококалорійної дієти щурами. Узгоджена робота GP та GT попереджає подальше прогресування пероксидації, розповсюдження неферментативних реакцій, накопичення вторинних метаболітів.

У тварин, яким давали дрібнодисперсний порошок фенугрека разом з висококалорійною дієтою, зареєстровано підвищення ферментативної активності GP в 1,2 раза та зниження ферментативної активності GT в 1,3 раза порівняно з тваринами, які споживали лише висококалорійну дієту. Таким чином, доповнення висококалорійної дієти біологічно активними сполуками насіння *Trigonella foenum graecum L.* здійснювало модульований вплив на вміст GSH та активність GP, GT у сироватці крові дослідних тварин. Вивчення його хімічного складу показало наявність амінокислот, які беруть безпосередню участь у синтезі глутатіону [19]. Саме сірковмісні амінокислоти (цистеїн і метіонін) є важливими в синтезі GSH. Нині відомо, що кількість та якість харчового білка і метіоніну впливають на вміст глутатіону в печінці щурів. Навіть порівняно невелике додавання в раціон сірковмісних амінокислот приводить до посилення його синтезу. Такі зміни досліджуваних показників за доповнення висококалорійної дієти 2% дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum L.*, ймовірно, свідчать про залучення цих компонентів антиоксидантної системи до реакцій знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на фоні розвитку ожиріння.

Аналізуючи отримані результати, можна заключити, що умови наших експериментів дозволили змодельовати дієтичне ожиріння у щурів. Використання 2% дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum L.* з висококалорійним раціоном знижує приріст маси тіла щурів. Це може бути зумовлено не зменшенням харчової активності тварин, а, ймовірно, пов'язане з впливом на метаболічні процеси (попередження всмоктування жирів, підвищення утилізації жирів).

Розвиток ожиріння у щурів супроводжувався порушенням гомеостазу в глутатіонзалежній антиоксидантній системі сироватки крові. Доповнення висококалорійної дієти порошком насіння *Trigonella foenum graecum* L. здійснювало позитивний модулюючий вплив на вміст GSH і активність GP, GT у тварин з експериментальним ожирінням.

Подальше вивчення змін показників глутатіонової ланки антиоксидантного захисту за умов застосування препаратів рослинного походження сприятиме пошуку та розробці нових засобів профілактики, щоб запобігти розвитку тяжких супутніх ускладнень надлишкової маси тіла.

**В.В. Конопельнюк, Л.І. Кот, Т.В. Коваль,
Т.Д. Хилько, І.В. Якубцова,
Т.Д. Преображенская, Л.И. Остапченко**

СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОРОШКА СЕМЯН ФЕНУГРЕКА У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

Исследовано содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность глутатионзависимых ферментов: глутатионпероксидазы (GP) и глутатион-S-трансферазы (GT) в сыворотке крови крыс при введении в диету семян *Trigonella foenum graecum* L. на фоне развития экспериментального ожирения. Установлено, что развитие ожирения у крыс сопровождалось нарушением гомеостазу в глутатион-зависимой системе сыворотки крови крыс. У животных, находившихся на высококалорийной диете, наряду со снижением (в 1,2 раза) содержания GSH уменьшалась активность GP (у 1,7 раза) и возрастала активность GT (у 1,7 раза) по сравнению с показателями контроля через 14 нед. Дополнение высококалорийной диеты 2%-ми мелкодисперсного порошка семян *Trigonella foenum graecum* L. уменьшало прирост массы тела крыс на 21% и осуществляло положительное модулирующее влияние на содержание GSH и активность GP, GT у животных с экспериментальным ожирением.

Ключевые слова: диетиндуцированное ожирение; восстановленный глутатион; глутатионпероксидаза; глутатионтрансфераза; мелкодисперсный порошок семян *Trigonella foenum graecum* L.

**V.V. Konopelnyuk, L.I. Kot, T.V. Koval,
T.D. Khilko, I.V. Yakubtsova,
T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko**

STATUS OF GLUTATHIONE-DEPENDENT LINK OF BLOOD ANTIOXIDANT SYSTEM UNDER APPLICATION OF FENUGREEK SEED POWDER IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL OBESITY

The content of reduced glutathione (GSH) and activity of glutathione-dependent enzymes: glutathione peroxidase (GP) and glutathione-S-transferase (GT) in blood serum of rats in the diet supplemented of fine powder seeds *Trigonella foenum graecum* L. on the background of experimental obesity. It was established that the development of obesity in rats was accompanied by violation of homeostasis in the glutathione-dependent system of blood serum. It has been shown that animals on high-calorie diet along 14 weeks had a decrease (1,2) in GSH concentration, a decline (1,7) in GP activity and the increase (1,7) of GT activity compared with control values. Addition to high-calorie diet 2% fine powder seeds *Trigonella foenum graecum* L. reduced the body weight gain by 21%, carried positive modulating effect on the content of GSH and GP, GT activity in animals with experimental obesity.

Key words: diet-induced obesity; reduced glutathione; glutathione peroxidase; glutathione transferase; fine powder seeds *Trigonella foenum graecum* L.

Taras Shevchenko National University of Kyiv.

REFERENCES

1. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 2007; 29: 1-5.
2. Markhon NA, Mamchur VI, Zhylyuk VI, Lievykh AE. Comparative analysis of experimental approaches in reproducing of metabolic syndrome. *J Med Biol Problems.* 2015; 1(17): 156-62. [Ukrainian].
3. Pasiyeshvili LM, Zheleznyakova NM, Pasiyeshvili TM. Obesity as a social problem. Stages of the disease formation in subjects with biliary diseases. *Contemp Gastroenterol.* 2008; 6: 6-9.
4. Patil S, Jain G. Holistic approach of *Trigonella foenum-graecum* in Phytochemistry and Pharmacology. *Curr Trends Technol Sci.* 2014; 3: 34-48.
5. Moradi Kor N., Moradi K. Physiological and pharmaceutical effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a multipurpose and valuable medicinal plant. *Global J Med Plant Res.* 2013; 1(2): 199-206.
6. Kaur J, Singh H, Khan MU. Multifarious therapeutic potential of fenugreek: a comprehensive review. *Int J Res Pharm Biomed. Sci.* 2011; 2(3): 863-71.
7. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2011; 12: 3117-32.
8. Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. Role of

- glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry*. 2014; 79(13): 1562-83.
9. Shen X.-H, Tang Q.-Y, Huang J, Cai W. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Experim. Biol Med*. 2010; 235: 47-51.
 10. Mokrasch LC, Teschke EJ. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Anal Biochem*. 1984; 140(2): 506-9.
 11. Hissin PJ, Hilf RA. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1): 214-26.
 12. Razygraev AV. Method of determination of glutathione peroxidase activity using hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Klin-Lab Konsilium*. 2004; 4: 19-22. [Russian].
 13. Vlasova SN, Shabunina EI, Pereslyagina IA. Activity of glutathione dependent enzymes in red blood cells liver chronic disease in children. *Lab Delo*. 1990; 8: 19-21. [Russian].
 14. Ghorbani A, Hadjzadeh M, Rajaei Z, Zendehbad SB. Effects of fenugreek seeds on adipogenesis and lipolysis in normal and diabetic rats. *Pakistan J Biol Sci*. 2014; 17: 523-8.
 15. Choudhary D; Chandra D; Choudhary S; Kale R.K. Modulation of glyoxalase, glutathione S-transferase and antioxidant enzymes in the liver, spleen and erythrocytes of mice by dietary administration of fenugreek seeds. *Food Chem*. 2001; 39(10): 989-97.
 16. Reznikov OH, Polumbryk OM, Balion YH, Polumbryk MO. Pro- and antioxidant systems and pathological processes in humans. *Bull NAS Ukraine*. 2014; 10: 17-29. [Ukrainian].
 17. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009; 390(3): 191-214.
 18. Iskra R. Condition of glutathione link of antioxidant system in different organs and tissues of rats at chromium nanoaquaquarcitate action. *Eksperim Clin Physiol Biochem*. 2011; 3: 28-33. [Ukrainian].
 19. Denisenko YK, Novgorodtseva TP. Effect of prolonged high-fat diet on thiol-disulfide homeostasis in rats. *Int J BioMed*. 2013; 3(3): 197-200.

Матеріал надійшов до редакції 12.05.2016