

Marcin Cichoń
Urszula Błaszczyk
Jolanta Zalejska-Fiolka

WPŁYW KWASU α -LIPONOWEGO NA PROCESY WOLNORODNIKOWE W SUROWICY SZCZURÓW UTRZYMYWANYCH NA DIECIE WYSOKOTŁUSZCZOWEJ

EFFECT OF α -LIPOIC ACID ON FREE RADICAL PROCESSES
IN SERUM OF RATS ON HIGH FAT DIET

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach / Medical University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra i Zakład Biochemii / School of Medicine
with the Division of Dentistry in Zabrze, Department of Biochemistry

STRESZCZENIE

Wstęp: Proces smażenia olejów roślinnych prowadzi do obniżenia ich właściwości biologicznych i żywieniowych oraz w konsekwencji do zaburzeń homeostazy organizmu. Czynnikiem wspomagającym stabilność olejów są substancje o charakterze antyoksydacyjnym. Celem pracy było określenie wpływu kwasu α -liponowego na stężenie grup sulfhydrylowych, nadtlenków lipidowych, dialdehydu malonowego oraz kreatyniny i mocznika w surowicy szczurów utrzymywanych 3 miesiące na diecie wysokotłuszczowej wzbogaconej w olej rzepakowy poddany obróbce wysokotemperaturowej. **Materiał i metody:** Materiał stanowiło 36 szczurów podzielonych równo na 6 grup: kontrolną utrzymywaną na hodowlanej paszy standardowej (hodowlana dieta standardowa – HDS), grupę OU (HDS z 10% dodatku oleju utlenionego (OU)), grupę ALA10 (HDS z dodatkiem kwasu α -liponowego (ALA) w dawce 10 mg/kg masy ciała (mc.)), grupę OU+ALA10 (HDS z dodatkiem utlenionego oleju oraz ALA jw.), grupę ALA50 (HDS z dodatkiem ALA w dawce 50 mg/kg mc.) i grupę OU+ALA50 (HDS z dodatkiem utlenionego oleju oraz ALA jw.). Olej był utleniany w 180°C przez 6 godz. **Wyniki:** Zaobserwowano obniżenie stężenia grup sulfhydrylowych (protein sulfhydryl groups – PSH) dla wszystkich grup badanych vs grupa kontrolna (K) z wyłączeniem grupy ALA10 oraz istotnie wyższe stężenie PSH w grupach OU+ALA10 i OU+ALA50 vs OU; wzrost stężenia nadtlenków lipidowych (lipid hydroperoxide – LHP) dla grup OU, OU+ALA10 i OU+ALA50 vs K z jednoczesnym obniżeniem stężenia LHP dla wszystkich grup badanych vs OU; wzrost stężenia dialdehydu malonowego (malondialdehyde – MDA) w grupie OU względem wszystkich pozostałych grup. Zaobserwowano także podwyższenie stężenia kreatyniny i mocznika w grupie OU. **Wnioski:** Wykazano, że zastosowana dieta nasila proces peroksydacji lipidów oraz powoduje nasilenie utleniania grup sulfhydrylowych. Może także zaburzać czynność nerek. Podawanie z dietą kwasu liponowego w dawce 10 mg/kg mc. skutecznie hamuje proces peroksydacji lipidów oraz ochrania wolne grupy sulfhydrylowe. Med. Pr. 2017;68(3):391–399

Słowa kluczowe: dieta wysokotłuszczowa, dialdehyd malonowy, grupa sulfhydrylowa, kwas liponowy, nadtlenki lipidowe, kreatynina

ABSTRACT

Background: Oils are often fried which reduces their beneficial biological and nutritional properties, contributing to disturbances in homeostasis. Some antioxidant substances can improve stability of oils. The aim of the study was to examine the effect of α -lipoic acid (ALA) on the concentration of sulfhydryl groups, lipid peroxides, malondialdehyde, creatinine and urea in serum of rats fed high fat diet for 3 months. **Material and Methods:** Thirty six Wistar rats were equally divided into 6 groups: the control group on standard breeding diet (SB), oxidized oil (OU) group on SB with 10% oxidized oil, ALA10 group on SB with ALA 10 mg/kg of body weight (b.w.), OU+ALA10 group on SB with oxidized oil and ALA (10 mg/kg b.w.), ALA50 group on SB with ALA in a dose of 50 mg/kg b.w., OU+ALA50 group on SB with oxidized oil and ALA (50 mg/kg b.w.). Oil was oxidized in 180°C for 6 h. **Results:** We observed decrease in concentration of protein sulfhydryl (PSH) groups in all study groups except for ALA10 vs. control group (C) and increase in OU+ALA10 and OU+ALA50 vs. OU; increase in the lipid hydroperoxide (LHP) concentration in OU, OU+ALA10 and OU+ALA50 vs. C and decrease in all study groups vs. OU; increase of malondialdehyde (MDA) in OU vs. all other groups. And also increase in creatinine and urea concentration in OU group. **Conclusions:** High fat diet rich in oxidized oil intensifies the lipid peroxidation process and oxidation of sulfhydryl groups. It can also impair kidney function. Administration of lipoic acid in a dose of 10 mg/kg b.w. inhibits the lipid peroxidation and protects sulfhydryl groups. Med Pr 2017;68(3):391–399

Key words: high fat diet, malondialdehyde, sulfhydryl groups, lipoic acid, lipid peroxides, creatinine

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Jolanta Zalejska-Fiolka, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, e-mail: jzalejskafiolka@sum.edu.pl
Nadesłano: 13 lipca 2016, zatwierdzono: 8 września 2016

WSTĘP

Tłuszcze roślinne i rybie stanowią rezerwuariat polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny omega 3 i omega 6, dostarczających organizmowi wielu związków istotnych dla jego prawidłowego funkcjonowania [1–7]. Przyjmowane z pokarmem oleje są często poddawane smażeniu, co powoduje spadek ich korzystnych właściwości biologicznych i żywieniowych oraz wpływa na intensyfikację procesów wolnorodnikowych przyczyniających się w efekcie do zaburzenia homeostazy organizmu *via* stres oksydacyjny [8–10]. Z uwagi na skład kwasów tłuszczowych oleje charakteryzują się różną stabilnością oksydacyjną. Konieczne jest więc przeprowadzanie badań oceniających wpływ spożycia utlenionych olejów roślinnych na zaburzenia homeostazy organizmu, w szczególności na jego status oksydacyjny.

W dobie stale narastającego problemu otyłości i towarzyszących jej chorób metabolicznych istotne wydaje się także poszukiwanie substancji egzogennej lub/i endogennej o silnym działaniu antyoksydacyjnym, pełniących równocześnie istotną funkcję w metabolizmie. Do substancji takich zalicza się kwas α -liponowy (ALA). Występuje on w 2 formach – utlenionej oraz zredukowanej, które wykazują działanie antyoksydacyjne. Właśnie ta cecha powoduje, że ALA efektywnie oddziałuje na komórki i tkanki, bez względu na ich rodzaj [11,12]. Ponadto łatwo wchłania się z przewodu pokarmowego oraz przechodzi przez barierę krew–mózg. Jest rozpuszczalny w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych [13]. Wykazuje silne właściwości przeciwutleniające, co jest szczególnie istotne, gdyż wysokie stężenie reaktywnych form tlenu w warunkach stresu oksydacyjnego stanowi poważne zagrożenie dla organizmu [14].

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie i określenie wpływu diety wysokotłuszczowej zawierającej olej roślinny poddawany obróbce wysokotemperaturowej oraz kwasu α -liponowego na stężenie białka całkowitego, grup sulfhydrylowych oraz dialdehydu malonowego i nadtlenków lipidowych w surowicy szczurów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 36 szczurach, samcach w wieku 4,5 miesiąca (o wadze początkowej 300 ± 5 g), szczepu Wistar. Zwierzęta pochodziły z hodowli Centralnej Zwierzętarń Śląskiego Uniwersytetu Medycy-

nego w Katowicach. Projekt badań na zwierzętach uzyskał akceptację Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (KNW-022/LKE-1-25/08 z dnia 19.03.2008 r.).

Zwierzęta podzielono na 6 grup według schematu:

- grupa kontrolna K (N = 6) – utrzymywana na hodowlanej paszy standardowej (hodowlana dieta standardowa – HDS),
- grupa OU (N = 6) – utrzymywana na HDS z 10% dodatku utlenionego oleju (OU) rzepakowego,
- grupa ALA10 (N = 6) – utrzymywana na HDS z dodatkiem kwasu α -liponowego w dawce 10 mg/kg masy ciała (mc.) szczura,
- grupa OU+ALA10 (N = 6) – utrzymywana na HDS z 10% dodatku utlenionego oleju oraz kwasu α -liponowego w dawce 10 mg/kg mc. szczura,
- grupa ALA50 (N = 6) – utrzymywana na HDS z dodatkiem kwasu α -liponowego w dawce 50 mg/kg mc. szczura,
- grupa OU+ALA50 (N = 6) – utrzymywana na HDS z 10% dodatku utlenionego oleju oraz kwasu α -liponowego w dawce 50 mg/kg mc. szczura.

Podczas trwania eksperymentu wszystkie zwierzęta pozostawały pojedynczo w klatkach plastikowo-metalowych wyścielanych trocinami. Przez cały czas trwania doświadczenia zwierzęta miały zachowany cykl 12-godzinny (7:00–19:00 faza jasna, 19:00–7:00 faza ciemna), dostęp do wody *ad libitum*, a do paszy – w określonych poniżej ilościach. Wszystkie zwierzęta otrzymywały paszę standardową wyprodukowaną w Zakładzie Żywienia Zwierząt Instytutu Zootechnicznego w Brzezinach.

Olej rzepakowy dodawany do paszy poddawano utlenianiu przez 6 godz. w temperaturze 180°C w termostacie z wymuszonym obiegiem powietrza. Początkowa liczba nadtlenkowa oleju rzepakowego wynosiła 0,47 mEqO₂/kg, a końcowa – 11,20 mEqO₂/kg.

Dzienne dawki oleju wynosiły 10 g/kg mc., a kwasu α -liponowego (prod. Wörwag Pharma GmbH and Co. KG, Niemcy) – 10 mg/kg mc. lub 50 mg/kg mc. szczura. Ilość stosowanych dodatków przeliczano na masę zwierzęcia i modyfikowano z czasem trwania eksperymentu. Dzienne racjonowanie paszy przeliczano na kilogram masy ciała zwierząt i wynosiło ono 100 g paszy/kg mc./24 godz. dla szczura. Zarówno olej, jak i kwas α -liponowy podawano w granulacie paszowym. Paszę przygotowywano w porcjach wystarczających na 1 miesiąc skarmiania i do momentu podania zwierzętom przechowywano w zamrażarce w –20°C, co zapobiegało niekontrolowanemu utlenieniu jej składników.

Hodowlana pasza standardowa (HDS) (bytowa) dla szczurów (Labofeed B) w przeliczeniu na 100 g diety zawierała: 15 g białka, 3 g tłuszczów, 6 g włókna i 54 g węglowodanów, czyli: 20% energii pochodziło z białka, 9% z tłuszczów i 70% z węglowodanów.

Dziesięcioprocentowy dodatek oleju spowodował zmianę diety na wysokotłuszczową: 18% energii pochodziło z białka, 42% z tłuszczów i 39% z węglowodanów.

Powyższe substancje podawano przez 3 miesiące. Po tym czasie zwierzęta usypiano, stosując iniekcję dootrzewnową.

Opis procedury eutanazji

Eutanazji dokonano przez otwarcie klatki piersiowej i wykrwawienie przez pobranie krwi z prawej komory serca w głębokiej anestezji uzyskanej przez podanie mieszaniny droperydolu (dawka 0,2 mg/kg mc./i.m.), fentanylu (dawka 0,1 mg/kg mc./i.m.) i ketaminy (dawka 50 mg/kg mc./i.m.). Użycie tych leków jest metodą zalecaną przy zabiegach prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych, a zastosowanie ketaminy – anestetyku infuzyjnego o dodatkowym działaniu przeciwbólowym – niewątpliwie ułatwia przeprowadzenie zabiegu eutanazji, eliminując ewentualne bodźce bólowe. Zastosowany środek usypiający nie wpływał na wyniki przeprowadzonych badań.

Zwłoki zwierząt zabezpieczono w pojemnikach polietylenowych i przekazano w stanie zamrożenia do utylizacji zgodnie z odpowiednimi przepisami.

Oznaczenia biochemiczne w surowicy

Krew w ilości 10 cm³ pobierano każdorazowo z prawej komory serca szczura. Po odwirowaniu (10 min, 3000 obrotów/min) surowicę zamrażano w temperaturze -75°C do momentu podjęcia badań biochemicznych.

Oznaczanie stężenia grup sulfhydrylowych (PSH)

Stężenie grup sulfhydrylowych w surowicy oznaczono wg Kostera i wsp. [15], zmodyfikowaną metodą półautomatyczną z wykorzystaniem czytnika VICTOR-X3 firmy PerkinElmer przy filtrze 405 nm. Metoda oparta jest na wykorzystaniu kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) (DTNB), który ulega redukcji przez związki zawierające grupy sulfhydrylowe, dając pochodną anionową 5-tio-2-nitrobenzoesową o żółtym zabarwieniu. Stężenie grup sulfhydrylowych wyliczono z krzywej kalibracyjnej przy użyciu glutationu zredukowanego jako wzorca. Podstawą do obliczeń jest różnica absorbancji próby badanej po odjęciu odpowiadającej jej wartości próby ślepej. Stężenia wyrażane są w µmol/l.

Oznaczanie stężenia nadtlenu lipidowego (LHP)

Stężenie LHP w surowicy oznaczano metodą Södergre-na i wsp. [16], przy użyciu oranżu ksylenowego. Procedura jest oparta na utlenianiu jonów żelaza (II) do jonów żelaza (III) w kwaśnym środowisku. Następnie jony żelaza (III) z oranżem ksylenowym tworzą barwny kompleks, aż do niebiesko-purpurowego zabarwienia. Odczytu dokonano przy filtrze 560 nm z wykorzystaniem czytnika VICTOR-X3 firmy PerkinElmer. Stężenie odczytano z krzywej wzorcowej sporządzonej z pomocą odpowiednich stężeń H₂O₂. Wartości wyrażano w µmol/l.

Oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)

Stężenie MDA oznaczano w surowicy, wykorzystując jego reakcję z kwasem tiobarbiturowym wg Ohkawy i wsp. [17]. Do odczytu wykorzystano spektrofotometr LS45 firmy PerkinElmer przy długości fali λ = 515 nm (wzbudzenie) i λ = 522 nm (emisja). Odczyt spektrofotometryczny w przeciwieństwie do spektrofotometrycznego (przy długości fali 532 nm) jest bardziej swoisty – nie przeszkadzają interferencje ze strony hemoglobiny i barwników żółciowych. Metoda została zmodyfikowana poprzez dodanie siarczanu (VI) sodu oraz butylowanego hydroksytoluenu (BHT), co dodatkowo zwiększyło swoistość metody. Stężenia MDA odczytano z krzywej standardowej, stosując jako standard 1,1,3,3-tetraetoksypropan, i wyrażono w µmol/l.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica 10.0. Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Porównanie zmian między grupami badanymi przeprowadzono, używając testu ANOVA Kruskala-Wallisa. W celu porównania określonego parametru w obrębie grupy zastosowano test Manna-Whitneya. Za istotne statystycznie przyjęto wyniki, dla których p < 0,05.

WYNIKI

Wyniki przedstawiono w tabeli 1. oraz na rycinach 1–3.

Na rycinie 1. przedstawiono stężenie grup sulfhydrylowych (PSH) w surowicy we wszystkich grupach zwierząt. Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia PSH we wszystkich grupach badanych względem grupy kontrolnej, z wyłączeniem grupy ALA10, otrzymującej wyłącznie kwas liponowy w dawce 10 mg/kg mc. W grupie OU otrzymującej wyłącznie utleniony olej stężenie obniżyło się o 76% względem grupy K

($p < 0,05$), 77% względem grupy ALA10 ($p < 0,001$) oraz 63% względem grupy ALA50 ($p < 0,004$). Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia PSH w grupie ALA10 względem ALA50 ($p < 0,006$) oraz istotnie wyższe stężenie PSH w grupach OU+ALA10 i OU+ALA50 względem grupy OU, odpowiednio o: 55% i 59% ($p < 0,004$).

Na rycinie 2. przedstawiono całkowite stężenie nadtlenków lipidowych w surowicy we wszystkich grupach zwierząt. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia LHP o 263% w grupie otrzymującej wyłącznie olej utleniony oraz wzrost o 212% i 242%, odpowiednio, dla grup otrzymujących olej utleniony z dodatkiem kwasu α -liponowego w dawkach 10 mg/kg mc. (OU+ALA10) i 50 mg/kg mc. (OU+ALA50) w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie między pozostałymi grupami badanymi a grupą kontrolną.

Jednocześnie zaobserwowano istotnie statystycznie niższe stężenia LHP dla wszystkich grup badanych względem grupy otrzymującej wyłącznie olej utleniony. Dla grupy ALA10 (otrzymującej tylko kwas α -liponowy w dawce 10 mg/kg mc.) stężenie LHP było niższe o 160,5% ($p < 0,006$), dla grupy ALA50 – niższe o 146% ($p < 0,004$) i dla OU+ALA10 oraz OU+ALA50 – niższe odpowiednio o 16,3% ($p < 0,006$) i 6,1% ($p < 0,004$) względem grupy OU. Nie zaobserwowano istotnych zmian między grupami ALA10 i ALA50 ($p < 0,465$).

Na rycinie 3. przedstawiono stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w surowicy we wszystkich grupach zwierząt. Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia MDA dla wszystkich grup badanych oprócz grupy otrzymującej wyłącznie olej utleniony, gdzie nastąpił wzrost stężenia MDA o 23% w porównaniu z grupą kontrolną. W pozostałych grupach odnotowano obniżenie stężenia MDA, dla grupy ALA10 – o 294%, dla grupy OU+ALA10 – o 87%, dla grupy ALA50 – o 40% i dla grupy OU+ALA50 – o 38% względem grupy kontrolnej ($p < 0,05$).

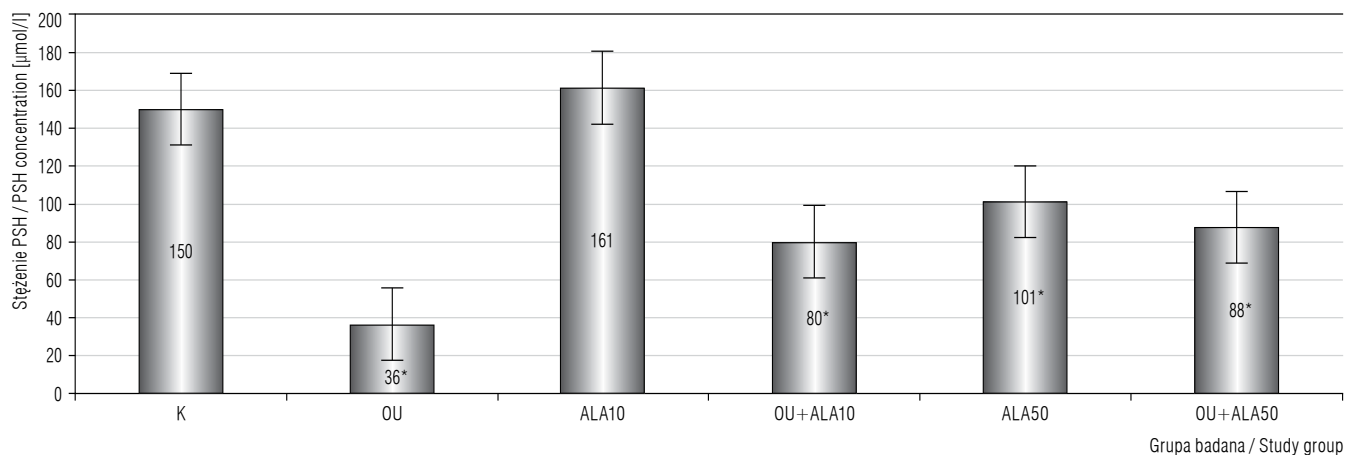
Zaobserwowano także istotnie statystycznie niższe stężenia MDA dla wszystkich grup badanych względem grupy OU. Stężenie MDA w grupie ALA10 było niższe o 385% ($p < 0,037$), dla OU+ALA10 – o 130% ($p < 0,004$), dla grupy ALA50 – o 72% ($p < 0,006$) i grupy OU+ALA50 – o 70% ($p < 0,004$). Ponadto zaobserwowano istotnie statystycznie niższe stężenie MDA o 182% dla grupy ALA10 względem grupy ALA50 ($p < 0,004$).

W tabeli 1. przedstawiono stężenia mocznika i kreatyniny oznaczone w surowicy zwierząt utrzymywanych

Tabela 1. Stężenie mocznika i kreatyniny w surowicy szczurów utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej
Table 1. Concentration of urea and creatinine in the serum of rats on high fat diet

Substancja Substance	Stężenie w surowicy w poszczególnych grupach badanych Serum concentration in individual study groups											
	K		OU		ALA10		OU+ALA10		ALA50		OU+ALA50	
	M±SD	P	M±SD	P	M±SD	P	M±SD	P	M±SD	P	M±SD	P
Mocznik / Urea [mg/dl]	45,16±7,61	0,065	57,13±4,51	0,065	46,80±4,08	0,465	52,60±6,42	0,100	48,08±4,80	0,143	51,92±4,73	0,144
Kreatynina / Creatinine [mg/dl]	0,57±0,04	0,022	0,73±0,10	0,022	0,62±0,04	0,118	0,61±0,05	0,199	0,62±0,08	0,303	0,67±0,09	0,057

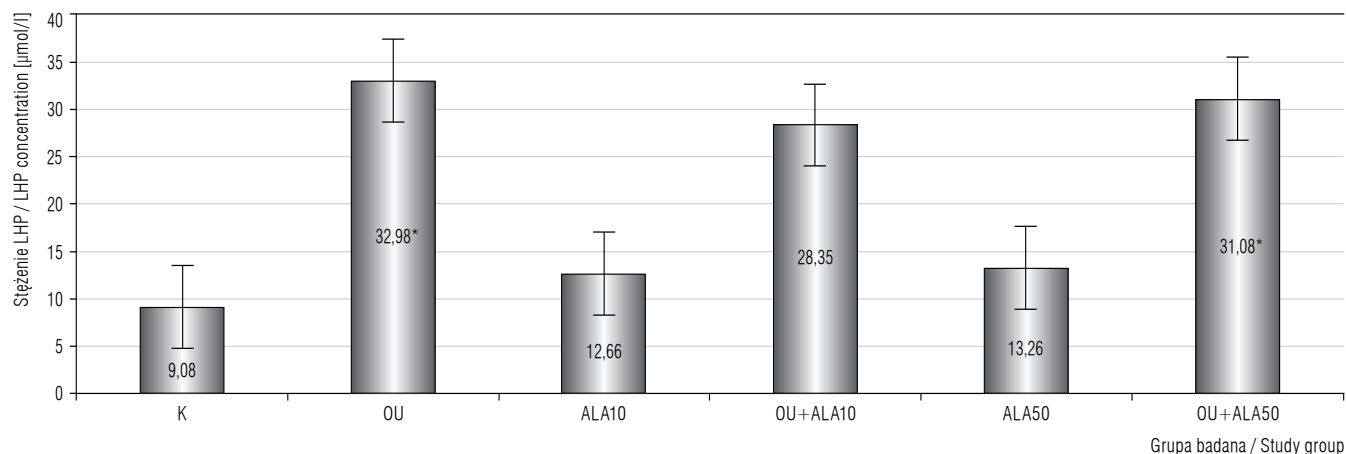
K – grupa kontrolna / control group, OU – pasza standardowa z 10% dodatkiem oleju utlenionego / standard diet with 10% oxidized oil, ALA10 – kwas α -liponowy w dawce 10 mg/kg masy ciała (mc.) / α -lipoic acid 10 mg/kg of body weight (b.w.), ALA50 – kwas α -liponowy w dawce 50 mg/kg mc. / α -lipoic acid 50 mg/kg b.w.
M – średnia / mean, SD – odchylenie standardowe / standard deviation, p – poziom istotności statystycznej względem grupy kontrolnej / statistical significance vs. control group.



* p istotne statystycznie vs grupa kontrolna / p statistically significant vs. control group.

Skróty jak w tabeli 1 / Abbreviations as in Table 1.

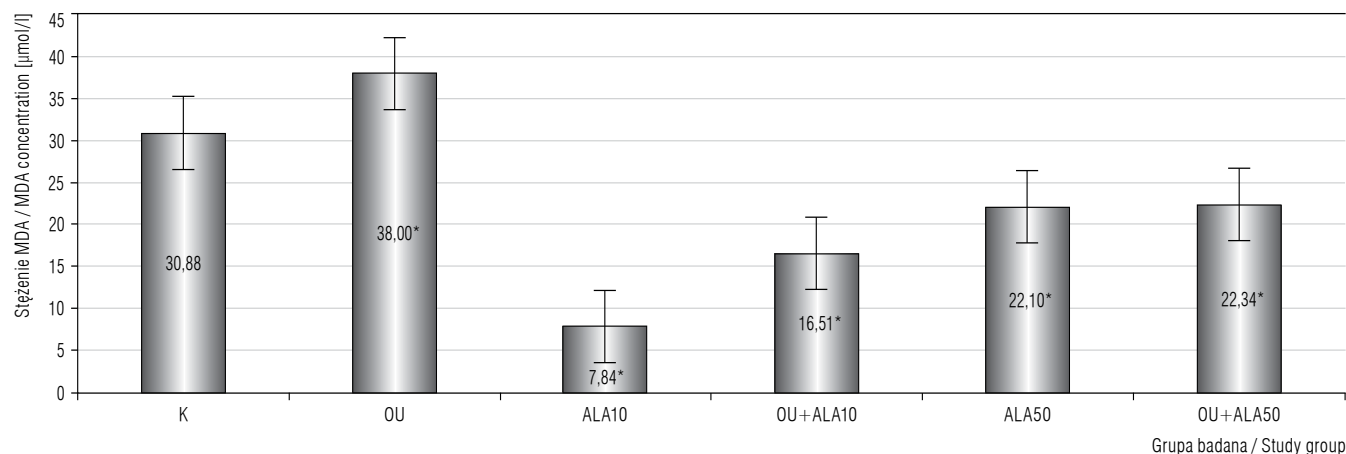
Ryc. 1. Stężenie grup sulfhydrylowych (PSH) w surowicy szczurów utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej
Fig. 1. Concentration of protein sulfhydryl groups (PSH) in serum of rats on high fat



* p istotne statystycznie vs grupa kontrolna / p statistically significant vs. control group.

Skróty jak w tabeli 1 / Abbreviations as in Table 1.

Ryc. 2. Stężenie nadtlenków lipidowych (LHP) w surowicy szczurów utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej
Fig. 2. Concentration of lipid hydroperoxides (LHP) in serum of rats on high fat diet



* p istotne statystycznie vs grupa kontrolna / p statistically significant vs. control group.

Skróty jak w tabeli 1 / Abbreviations as in Table 1.

Ryc. 3. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w surowicy szczurów utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej
Fig. 3. Concentration of malondialdehyde (MDA) in serum of rats on high

na diecie wysokotłuszczowej z dodatkiem utlenionego oleju. Zaobserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie kreatyniny w grupie zwierząt OU, otrzymującej utleniony olej ($p = 0,02$), oraz wyższe (na granicy istotności statystycznej, $p = 0,057$) stężenie kreatyniny w grupie OU+ALA50 i mocznika w grupie OU ($p = 0,065$).

OMÓWIENIE

Dieta wysokotłuszczowa, w szczególności bogata w utlenione tłuszcze, może nasilać proces peroksydacji lipidów, a więc syntezy zwiększonej ilości zarówno nadtlenków lipidowych, jak i końcowych produktów peroksydacji zaburzających struktury komórkowe. Konsekwencją stosowania takiej diety jest stres oksydacyjny, charakteryzujący się zaburzeniem stosunku substancji o działaniu antyoksydacyjnym do substancji o działaniu prooksydacyjnym.

Uzyskane wyniki oznaczeń stężeń nadtlenków lipidowych oraz dialdehydu malonowego wskazują jednoznacznie na intensyfikację procesów peroksydacji lipidów. Wykazano bowiem istotnie statystycznie podwyższenie stężenia nadtlenków lipidowych w surowicy w grupach otrzymujących HDS z utlenionym olejem oraz utrzymywanych na HDS podawaną łącznie z kwasem liponowym w 2 zastosowanych dawkach. Należy jednak zaznaczyć, że wzrost w grupach OU+ALA10 i OU+ALA50 był istotnie niższy niż w grupie OU. Wykazano więc ochronny wpływ zastosowanej substancji w przebiegu powstawania nadtlenków lipidowych. Uzyskane wyniki, dotyczące wysokich stężeń nadtlenków lipidowych w surowicy w grupach otrzymujących HDS z utlenionym olejem roślinnym, mogą być rezultatem wysokiej zawartości egzogennej nadtlenków w utlenionym oleju rzepakowym oraz możliwości indukowania przez składniki tego oleju endogennej peroksydacji lipidów.

Podobne wyniki uzyskano dla stężenia dialdehydu malonowego (MDA). Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia MDA w grupie zwierząt otrzymujących HDS z utlenionym olejem roślinnym. Dla pozostałych grup badanych zaobserwowano istotnie niższe stężenie tego parametru w porównaniu z grupą OU. Świadczy to o skuteczności kwasu liponowego w hamowaniu procesów peroksydacji lipidów w warunkach eksperymentalnego stresu oksydacyjnego.

Tabatabaei i wsp. [18] zaobserwowali, że spożywanie oleju roślinnego, który utleniało przez 48 godz. w 180°C, powodowało istotny wzrost stężenia MDA

w surowicy szczurów. Z badań Zalejskiej-Fiolki i wsp. [8,9] wynika także, że spożycie utlenionego oleju rzepakowego jest czynnikiem indukującym peroksydację lipidów oraz powodującym zaburzenie homeostazy organizmu zwierząt doświadczalnych. W badaniach wykazano wzrost stężenia MDA w surowicy królików utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej z dodatkiem utlenianego przez 7 dni w 120°C oleju rzepakowego. W innych badaniach tych autorów wykazano, że dieta bogata w olej rzepakowy utleniany w 180°C przez 6 godz. spowodowała zaburzenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych wskutek nasilenia peroksydacji lipidów, ocenianej poprzez stężenie MDA, które wzrastało zarówno w surowicy, jak i homogenatach wątroby szczurów utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej z dodatkiem utlenionego oleju [10].

Wydaje się, że wzrost stężenia MDA zachodzący wskutek spożywania diety wysokotłuszczowej, bogatej w utlenione w wysokiej temperaturze oleje, wynika z nasilenia procesu peroksydacji lipidów oraz prawdopodobnie z indukcji autooksydacji natywnych polienowych kwasów tłuszczowych, będącej skutkiem stosowanej diety.

Zastosowany w prezentowanej pracy dodatek kwasu liponowego skutecznie hamował proces peroksydacji lipidów. Wydaje się więc, że mimo zdolności organizmu do syntezy ALA oraz jego zawartości w naturalnych składnikach diety (tj. podrobach, zielonych warzywach, owocach) suplementacja jest konieczna, szczególnie w krajach wysokorozwiniętych, gdzie odsetek osób źle się odżywiających jest ciągle wysoki. Suplementy zawierające ALA w dawkach 200–600 mg skutecznie pokrywają dzienne zapotrzebowanie organizmu na tę substancję. Kwas α -liponowy jest szybko wchłaniany i usuwany, gdyż jego czas połowicznego rozpadu wynosi około 30 min [19]. Ostateczna ilość absorbowanej substancji jest jednak zmienna i wynosi 20–40%. W badaniach Teicherta i wsp. [20] wykazano, że dieta może hamować przyswajanie suplementowanego ALA.

Szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu prowadzi do kumulowania się produktów oksydacji. Organizm wytworzył wiele mechanizmów chroniących komórki przed ich szkodliwym wpływem. Jednym z podstawowych zadań systemu obronnego jest przystosowanie organizmu pod względem organizacji strukturalnej komórek. Działanie takie umożliwia izolację miejsc, w których zachodzą reakcje przebiegające z wytwarzaniem wolnych rodników jako produktów ubocznych procesów fizjologicznych i nefizjologicznych. Wolne rodniki i reaktywne formy tlenu reagują ze wszystkimi

składnikami komórek, jednak największe uszkodzenia powodują w białkach, kwasach nukleinowych i tłuszczach. Zmiany oksydacyjne w białkach są efektem tlenowego metabolizmu komórkowego, a mediatorem uszkodzenia białek jest głównie rodnik hydroksylowy, podczas gdy anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru są często zaangażowane w inne modyfikacje, tj. utlenianie grup sulfhydrylowych (PSH) [21]. Prawdopodobny mechanizm polega na reakcji nadtlenuoazotanu (III) z wolną grupą sulfhydrylową. Ponadto ten wysoce reaktywny rodnik wykazuje zdolność tworzenia nitrotyrozyn oraz hamuje aktywność fibrynogenu i czynnika tkankowego [22].

Do szkodliwych czynników środowiskowych, mających zdolność oksydacyjnego modyfikowania białek, zalicza się ekspozycję organizmu na stres, leki, promieniowanie ultrafioletowe (UV), ultradźwięki, dym tytoniowy czy też niewłaściwą dietę, w tym wysokotłuszczową. Uszkodzenia oksydacyjne grup tiolowych prowadzą z kolei do zaburzenia homeostazy organizmu, m.in. zaburzeń aktywności białek przezłonowych, enzymów i transmittorów. Jednocześnie grupy PSH pozostają w równowadze z grupami tiolowymi glutationu, którego funkcją jest utrzymywanie grup tiolowych w formie zredukowanej [23].

W przedłożonej pracy wykazano istotny wpływ podawanego z dietą kwasu liponowego na stężenie grup sulfhydrylowych. Zaobserwowano, że dodatek kwasu liponowego, szczególnie w dawce 10 mg/kg mc., zwiększa stężenie wolnych grup tiolowych w surowicy. Powoduje także zwiększenie stężeń PSH w grupach ekspozycyjnych na HDS z dodatkiem ALA. Obserwowany kierunek zmian wskazuje na zwiększenie zdolności antyoksydacyjnej surowicy pod wpływem ALA.

Podobne wyniki uzyskali Ciejka i wsp. [21], którzy zaobserwowali wzrost stężenia PSH pod wpływem 2-tygodniowej ekspozycji zwierząt na pole magnetyczne o niskiej częstotliwości. Również w innych badaniach zauważyli oni wzrost stężenia PSH pod wpływem pola magnetycznego w tkance mięśnia poprzecznie prążkowanego [24]. Cardozo i wsp. [25] także zaobserwowali obniżenie stężenia grup sulfhydrylowych pod wpływem diety wysokotłuszczowej, z równoczesnym podwyższeniem ich stężenia pod wpływem dodanego do diety soku winogronowego.

Uzyskane wyniki badań wykazały także istotny wzrost stężenia kreatyniny w surowicy w grupie otrzymującej utleniony olej w porównaniu z grupą kontrolną oraz wzrost na granicy istotności statystycznej w grupie OU+ALA50. Równocześnie nie wykazały

istotnych różnic w stężeniu mocznika w badanych grupach względem grupy kontrolnej, zaobserwowano jedynie wzrost jego stężenia w grupie OU na granicy istotności statystycznej. Wydaje się prawdopodobne, że zastosowanie diety wysokotłuszczowej z dodatkiem utlenionego oleju może prowadzić do upośledzenia funkcjonowania nerek. Jednocześnie wykazano korzystny wpływ suplementacji ALA w dawce 10 mg/kg mc. na czynność nerek zwierząt. Dla wyższej dawki ALA nie zaobserwowano takiego efektu.

Z badań innych autorów wynika, że stosowanie diety wysokotłuszczowej, w której udział energii uzyskanej z tłuszczów wzrasta do około 77%, a białek i węglowodanów maleje do, odpowiednio, 14% i 9%, prowadzi – obok kwasicy ketonowej, nasilenia zmian miażdżycowych i zaburzeń gospodarki węglowodanowej – do upośledzenia czynności nerek poprzez zwiększenie przesączania kłębuszkowego oraz kamicy nerkowej [26–28].

Poczynione obserwacje wymagają weryfikacji i dalszego uzupełnienia m.in. o stężenie białka całkowitego, albumin i globulin w celu sprawdzenia, czy zastosowana dieta wywiera również istotny wpływ na wątrobową syntezę białka.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, można stwierdzić, że w warunkach przeprowadzonego eksperymentu zastosowana dieta powoduje zaburzenie homeostazy oksydacyjnej organizmu, natomiast podany kwas liponowy wykazuje silne działanie antyoksydacyjne, szczególnie w niższej dawce, ochraniając grupy sulfhydrylowe przed utlenianiem. W oparciu o uzyskane wyniki można przyjąć, że suplementacja kwasu liponowego, w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego dietą wysokotłuszczową bogatą w utleniony olej, ochrania organizm przed intensyfikacją procesów wolnorodnikowych.

Podsumowując wyniki badań, można także wyciągnąć wnioski, że skuteczniejsza wydaje się dawka 10 mg/kg mc., a zastosowany w badaniu kwas liponowy wydaje się być substancją o korzystnym potencjale, godną polecenia szczególnie osobom prowadzącym niehigieniczny tryb życia.

WNIOSKI

Wykazano, że dieta wysokotłuszczowa, bogata w utleniony olej roślinny, nasila proces peroksydacji lipidów obserwowany poprzez wzrost stężenia dialdehydu malonowego oraz nadtlenuków lipidowych w surowicy oraz powoduje nasilenie utleniania grup sulfhydrylowych,

co świadczy o niekorzystnym wpływie zastosowanej diety na status oksydacyjny organizmu. Dieta ta może także prowadzić do upośledzenia czynności nerek.

Łączne podawanie z dietą wysokotłuszczową kwasu liponowego, szczególnie w dawce 10 mg/kg mc., hamuje proces peroksydacji lipidów obserwowany przez obniżenie stężenia MDA i LHP, ochrania wolne grupy sulfhydrylowe przed utlenieniem obserwowane przez wzrost stężenia PSH w grupach OU+ALA względem grupy OU, a także wpływa korzystnie na czynność nerek.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Paniom Technik Ewie Chwalińskiej i Edycie Hudziec z Katedry i Zakładu Biochemii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego za pomoc w oznaczeniach biochemicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Zalejska-Fiolka J.: Ocena zaburzeń gospodarki lipidowej oraz stanu wątroby u królików utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej z dodatkiem nieutlenionych i utlenionych olejów roślinnych oraz kwasu α -liponowego. Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice 2013
- Świerczyński J., Wołyniec W., Chmielewski M., Rutkowski B.: Molekularny mechanizm działania kwasów tłuszczowych na profil lipidowy osocza (część I). *Przegl. Lek.* 2007;64(1):37–41
- Jazurek M., Dobrzyń P., Dobrzyń A.: Regulacja transkrypcji genów przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. *Postępy Biochem.* 2008;54(3):242–250
- Świerczyński J., Wołyniec W., Chmielewski M., Rutkowski B.: Molekularny mechanizm działania kwasów tłuszczowych na profil lipidowy osocza (część II). *Przegl. Lek.* 2007;64(1):42–47
- Le Morvan V., Dumon M.F., Palos-Pinto A., Berard A.M.: n-3 FA increase liver uptake of HDL-cholesterol in mice. *Lipids* 2002;37(8):767–772, <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0959-2>
- Cassagno N., Palos-Pinto A., Costet P., Breilh D., Darmon M., Bérard A.M.: Low amounts of trans 18:1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defence to oxidative stress in mice. *Br. J. Nutr.* 2005;94(3):346–352, <https://doi.org/10.1079/BJN20051512>
- Hannun Y.A., Obeid L.M.: Principles of bioactive lipid signaling lessons from sphingolipids. *Nature Rev.* 2008;9:139–150, <https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Zalejska-Fiolka J., Kasperczyk A., Kasperczyk S., Błaszczak U., Birkner E.: Effect of oxidised rapeseed oil with garlic on the concentration of 7-ketocholesterol, malondialdehyde, and free fatty acids in hypercholesterolaemic rabbits. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2007;51:431–438
- Zalejska-Fiolka J., Kasperczyk S., Kasperczyk A., Birkner E., Grucka-Mamczar E., Stawiarska-Pięta B. i wsp.: Influence of oxidated vegetable oil and garlic upon the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2004;48:453–459
- Zalejska J., Wielkoszyński T., Kasperczyk S., Kasperczyk A., Birkner E.: Effects of oxidized cooking oil and α -lipoic acid on liver antioxidants: Enzyme activities and lipid peroxidation in rats fed a high fat diet. *Biol. Trace Elem. Res.* 2010;138:272–281, <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8628-y>
- Gorąca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejka E., Skibska B.: Lipoic acid – Biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol. Rep.* 2011;63:849–858, [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70600-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4)
- Rochette L., Ghibu S., Richard C., Zeller M., Cottin Y., Vergely C.: Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013;57:114–125, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200608>
- Huk-Kolega H., Skibska B., Kleniewska P., Piechota A., Michalski Ł., Gorąca A.: Rola kwasu liponowego w zdrowiu i chorobie. *Pol. Merk. Lek.* 2011;31:183–185
- Li Y., Liu Y., Shi J., Jia S.: Alpha lipoic acid protects lens from H₂O₂-induced cataract by inhibiting apoptosis of lens epithelial cells and inducing activation of anti-oxidative enzymes. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2013;6:548–551, [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60094-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60094-2)
- Koster J.F., Biemond P., Swaak A.J.: Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1986;45:44–46, <https://doi.org/10.1136/ard.45.1.44>
- Södergren E., Nourooz-Zadeh J., Berglund L., Vessby B.: Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol range assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1998;37:137–146, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(98\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(98)00025-6)
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxidates in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979;95:351–358, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Tabatabaei N., Jamalian J., Owji A.A., Ramezani R., Karbalaie N., Rajaeifard A.R.: Effects of dietary selenium supplementation on serum and liver selenium, serum malondialdehyde and liver glutathione peroxidase activity in rats consuming thermally oxidized sunflower oil. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46(11):3501–3505, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.029>

19. Breithaupt-Grogler K., Niebch G., Schneider E., Erb K., Hermann R., Blume H.H. i wsp.: Dose-proportionality of oral thioctic acid – Coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999;8:57–65, [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(98\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(98)00061-X)
20. Teichert J., Kern J., Tritschler H.J., Ulrich H., Preiss R.: Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1998;36:625–628
21. Ciejka E., Kowalczyk A., Gorąca A.: Wpływ pola magnetycznego ekstremalnie niskiej częstotliwości na zawartość białka całkowitego oraz grup –SH w homogenatach wątroby. *Med. Pr.* 2014;65(5):639–644, <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00097>
22. Zabłocka A., Janusz M.: Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2008;62:118–124
23. Ponczek M.B., Wachowicz B.: Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Postępy Biochem.* 2005;51:140–145
24. Ciejka E., Kleniewska P., Skibska B., Gorąca A.: Effects of extremely low frequency magnetic field on oxidative balance in brain of rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011;62(6): 657–661
25. Cardozo M.G., Medeiros N., Lacerda Ddos S., de Almeida D.C., Henriques J.A., Dani C. i wsp.: Effect of chronic treatment with conventional and organic purple grape juices (*Vitis labrusca*) on rats fed with high-fat diet. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2013;33(8):1123–1133, <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9978-8>
26. Ostrowska L., Medard L.: Analiza tak zwanej diety optymalnej pod względem zawartości produktów wysokoenergetycznych oraz zaspokajania zapotrzebowania na witaminy i mikroelementy. *Med. Dypl.* 2002;11:117–124
27. Nazarewicz R.: Konsekwencje stosowania wysokotłuszczowych diet ketogenicznych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2007;4:371–374
28. Ostrowska L., Karczewski J.: Czy dieta tłuszczowa Kwasińskiego może być zalecana w leczeniu otyłości? Ocena składu diety. *Med. Metabol.* 2002;6:69