

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ З АЛОКСАН-ІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ЗА ДОДАВАННЯ МАГНІЙ ЦИТРАТУ

Шатинська О. А.

*Інститут біології тварини НААН
79034, Україна, Львів, вул. В. Стуса, 38*

shatynska.o@meta.ua

Проведено оцінку впливу різних доз магнію (100-, 250- і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла) у формі магній цитрату на стан вуглеводного обміну в тканинах печінки, підшлункової залози і скелетних м'язів щурів з алоксан-індукованим цукровим діабетом. Встановлено, що в щурів з експериментальним діабетом активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази знижувалася в усіх досліджуваних тканинах, а лактатдегідрогенази – лише в тканині печінки і підшлункової залози. З'ясовано, що введення до складу раціону тварин з експериментальним діабетом магній цитрату дозволило стабілізувати активність ензимів вуглеводного обміну.

Ключові слова: щур, магній цитрат, цукровий діабет, вуглеводний обмін.

Шатинская Е.А. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ТКАНЯХ КРЫС С АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ МАГНИЙ ЦИТРАТА / Институт биологии животных НААН; 79034, Украина, Львов, ул. В. Стуса, 38

Проводили оценку влияния различных доз магния (100-, 250- и 500 мг Mg^{2+} / кг массы тела) в форме магний цитрата на состояние углеводного обмена в тканях печени, поджелудочной железы и скелетных мышц крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом. Установлено, что у крыс с экспериментальным диабетом активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижалась во всех исследуемых тканях, а лактатдегидрогеназы – только в ткани печени и поджелудочной железы. Установлено, что введение в состав рациона животных с экспериментальным диабетом магний цитрата позволило стабилизировать активность энзимов углеводного обмена.

Ключевые слова: крыса, магний цитрат, сахарный диабет, углеводный обмен.

Shatynska O.A. ACTIVITY OF THE ENZYMES OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN THE RATS' TISSUES WITH ALLOXAN-INDUCED DIABETES BY ADDING MAGNESIUM CITRATE / Institute of Animal Biology UAAS; 79034, Ukraine, Lviv, V. Stus str., 38

Diabetes mellitus (DM), characterized by metabolic disorders related to high levels of serum glucose, is probably the most associated disease to Mg depletion in intra and extra cellular compartments. Magnesium is directly involved in numerous important biochemical reactions, and particularly is a necessary cofactor in over 300 enzymatic reactions and specifically in all those processes that involve the utilization and transfer of adenosine triphosphate (ATP).

Intracellular Mg is a critical cofactor for several enzymes in carbohydrate metabolism, and because of its role as part of the activated Mg-ATP complex required for all of the rate-limiting enzymes of glycolysis, regulates the activity of all enzymes involved in phosphorylation reactions.

Mg also is deeply involved in the regulation of insulin signaling, in the phosphorylation of insulin receptor kinase, in the post receptorial action of insulin, and in insulin-mediated cellular glucose uptake.

The aim of our study was to explore the effect of different doses of magnesium (100-, 250- and 500 mg Mg^{2+} / kg body weight), in the form of citrate, at the state of carbohydrate metabolism in the rats tissues.

The researches were conducted on the 25 white female Wistar rats, which were divided into five groups: CG – control group, RG 1-4 – research groups. During a month from the beginning of the studies the magnesium citrate solution in quantities of 100, 250 and 500 mg of Mg^{2+} /kg of body weight were added to drinking water to animals of the RG 2-4.

The experimental diabetes was induced in the animals of RG 2-4 on the backdrop of a 24-hour fasting by a single intraperitoneal administration of alloxan (150 mg/kg body weight) in 5% saline solution. Hyperglycemia was found by measuring blood glucose, collected from the tail vein, using a portable blood glucose meters.

Materials for the research were homogenates of the liver tissue, muscle tissue and pancreas tissue, which were selected after decapitation. In the tissues the activity of key enzymes of carbohydrate metabolism – glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and lactate dehydrogenase (LD) were determined.

The experimental intervention and euthanasia of animals carried out in accordance with international principles of the European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1985), the decision of the First National Congress on Bioethics (Kyiv, 2000).

Statistical analysis was performed on statistically significant differences between experimental groups by using the software package Excel. To assess differences in the averages normally distributed sample used parametric t-Student test.

In the research had been found that in the rats of RG2 the activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase decreased in muscle tissue, liver tissue and pancreas tissue ($P < 0,001$) comparing with the animals of control group. We also had found that activity of the lactate dehydrogenase, in the rats of RG2, decreased in the tissues of liver and pancreas, but increased in muscle tissue ($P < 0,05$) comparing with the animals of control group.

In the conditions of adding magnesium citrate, activity of the G6PD increased in the muscle ($P < 0,001$), liver and pancreas ($P < 0,01$) tissues in comparing with the animals of control group. Also we observed decreased activity of the LD in muscle tissue and increased activity of this enzyme in liver ($P < 0,05$) and pancreas tissues ($P < 0,01$) comparing with the animals with experimental diabetes.

Considering all the above, the prospects for further research in this direction seen in studying the effect of magnesium citrate as a means to prevent complications of diabetes, which will allow to develop new therapeutic agents to prevent and treat this disease.

Accordingly, normalization of the carbohydrate metabolism under the influence of magnesium citrate due to the fact that magnesium has positive effects on secretion and insulin action, improves insulin receptor sensitivity and a full response to the hormone action affects glucose uptake and, therefore, its normal utilization.

Key words: rat, magnesium citrate, diabetes, carbohydrate metabolism.

ВСТУП

Цукровий діабет характеризується порушенням обміну речовин, пов'язаний із високим рівнем глюкози та, ймовірно, з виснаженням магнію (Mg) у внутрішньо- і позаклітинних компартментах [1].

Магній бере безпосередню участь у численних важливих біохімічних реакціях, зокрема є необхідним кофактором понад 300 ензиматичних реакцій, особливо у тих процесах, які включають використання і передачу АТФ. Внутрішньоклітинний Mg як частина активованого комплексу Mg-АТФ, необхідний для всіх лімітуючих ензимів гліколізу, регулює діяльність ензимів, які беруть участь в реакціях фосфорилування [2].

Магній бере участь у транспортуванні глюкози через плазматичні мембрани клітин, може відігравати роль у секреції інсуліну та модулювати механізми передачі енергії від високоенергетичних фосфатних зв'язків [3, 4]. З огляду на це метою наших досліджень було з'ясування впливу різних кількостей магній цитрату на вуглеводний обмін у різних тканинах щурів за умов гіперглікемії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилися на 25 білих лабораторних щурах лінії Вістар, поділених на 5 груп: КГ – контрольна група; ДГ1 – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД) без будь-якої профілактики захворювання; ДГ2, ДГ3 і ДГ4 – тварини з ЕЦД, яким протягом 30 діб експерименту до питної води додавали Mg^{2+} , у вигляді цитрату магнію ($C_6H_6O_7Mg$) в дозах 100, 250 та 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла. Експериментальний цукровий діабет викликали на 20 добу шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення 5% розчину алоксанмоногідрату («Синбіас») у кількості 150 мг/кг маси тіла. Гіперглікемію виявляли шляхом вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра («Gamma-M»).

На 30 добу тварин виводили з експерименту під легким ефірним наркозом. Матеріалом для досліджень слугували гомогенати тканин щурів, у яких визначали активність основних ензимів вуглеводного обміну: глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г-6-ФДГ) і лактатдегідрогеназа (ЛДГ) [5].

Експериментальні втручання та евтаназія тварин проводилися з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000).

Експериментальні дані обробляли за допомогою пакета програм Excel. Для оцінки відмінностей середніх величин при нормальному характері розподілу вибіркової сукупності використовували параметричний t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що цукровий діабет характеризується порушенням усіх видів обміну речовин і, в першу чергу, вуглеводного. Метаболічні порушення при цукровому діабеті спричинені багатьма факторами, серед яких найбільше значення має тривала гіперглікемія [6].

Як свідчать результати проведених досліджень, активність Г-6-ФДГ, одного з основних ензимів пентозофосфатного шляху перетворення глюкози, знизилася на 15,3% у м'язах, 8,5% у печінці і 85,9% у підшлунковій залозі щурів ДГ1 порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 1).

Таблиця 1 – Активність Г-6-ФДГ у тканинах щурів, нмоль/хв×мг білка, (M ± m, n = 5)

| Група \ Тканина | Скелетні м'язи | Печінка | Підшлункова залоза |
|-----------------|----------------|--------------|--------------------|
| КГ | 37,94±1,67 | 928,47±36,56 | 367,16±8,21 |
| ДГ1 | 32,13±2,19 | 849,55±42,99 | 51,6±5,41*** |
| ДГ2 | 34,08±1,95 | 864,3±18,54 | 141,4±6,26## |
| ДГ3 | 41,39±2,53## | 888,04±17,65 | 168,51±9,33## |
| ДГ4 | 44,30±1,14### | 889,22±31,71 | 153,51±0,001## |

Примітка: ***p < 0,001 вірогідність показників ДГ1 порівняно з КГ

##p < 0,01; ###p < 0,001 вірогідність показників ДГ2, ДГ3, ДГ4 порівняно з ДГ1

Активність ЛДГ – ензиму кінцевої ланки гліколізу також знизилась у печінці на 4% та в підшлунковій залозі на 52,5% у тварин ДГ1 порівняно з тваринами КГ. Проте активність ЛДГ у м'язовій тканині тварин ДГ1 підвищилася на 46,9% порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 2). Важлива функція ЛДГ – це регуляція співвідношення кількості НАД⁺ і НАД·Н, оскільки саме воно впливає на швидкість багатьох каталітичних реакцій. За відсутності кисню у скелетних м'язах ЛДГ робить можливим окиснення НАД·Н до НАД⁺ внаслідок перетворення пірувату в лактат [7]. Отже, саме анаеробний гліколіз – основне джерело енергії для скелетних м'язів, які є основним місцем знешкодження глюкози шляхом перетворення її в глікоген [8].

Зниження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази й лактатдегідрогенази у тварин з ЕЦД може бути зумовлено порушеннями в гормональній регуляції вуглеводного обміну, який перебуває під контролем багатьох гормонів, основним з яких є інсулін [6]. За недостатності інсуліну порушується перенесення глюкози через цитоплазматичні мембрани тканин, а також зменшується її внутрішньоклітинна утилізація. Отже, в умовах

недостатнього засвоєння глюкози настає енергетичний голод, що своєю чергою, призводить до посилення глюконеогенезу, і як наслідок – до посилення гіперглікемії [9].

У результаті проведених досліджень на щурах, яким впоювали магній цитрат у кількості 100, 250 і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла, встановлені зміни показників вуглеводного обміну в тканинах внутрішніх органів.

За умови додавання магній цитрату, активність Г-6-ФДГ достовірно зростала в м'язах тварин ДГ3 і ДГ4: на 41,1% і 37,9% відповідно, порівняно із тваринами ДГ1 (табл. 1). Водночас спостерігалася тенденція до зниження активності ЛДГ у ДГ2-ДГ4 порівняно з тваринами з ЕЦД у ДГ1, на 7,3%, 22,9% і 28,6% відповідно (табл. 2).

Таблиця 2 – Активність ЛДГ у тканинах щурів, нмоль/хв×мг білка, ($M \pm m$, $n = 5$)

| Група \ Тканина | Скелетні м'язи | Печінка | Підшлункова залоза |
|-----------------|----------------|---------------------------|----------------------------|
| КГ | 79,31±24,03 | 135,39±3,87 | 442,82±32,26 |
| ДГ1 | 116,47±11,53 | 129,98±2,04 | 210,49±20,46* |
| ДГ2 | 107,93±4,22 | 158,18±10,22 [#] | 483,64±33,15 ^{##} |
| ДГ3 | 89,76±2,86 | 149,74±8,22 [#] | 334,33±8,5 |
| ДГ4 | 83,11±6,92 | 94,78±5,02 ^{###} | 401,62±24,57 [#] |

Примітка: * $p < 0,05$ вірогідність показників ДГ1 порівняно з КГ

[#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$ вірогідність показників ДГ2, ДГ3, ДГ4 порівняно з ДГ1

Встановлено, що за дії магній цитрату активність Г-6-ФДГ у печінці тварин ДГ2-ДГ4 проявляла тенденцію до підвищення порівняно з тваринами ДГ1, відповідно на 1,7%, 4,5% і 4,7% (табл. 1). Також слід зазначити, що у тварин ДГ2 і ДГ3 за додавання магній цитрату до питної води спостерігалася достовірне підвищення активності ЛДГ відповідно на 21,7% і 15,2%, однак зниження у ДГ4 на 2% порівняно із тваринами ДГ1 (табл. 2).

У β -клітинах підшлункової залози метаболізм глюкози має важливе значення для регуляції секреції інсуліну. Глюкоза захоплюється глюкозними транспортерами і фосфорилується під дією глюкокінази з генеруванням АТФ, який є основним рушієм глюкозо-індукованої секреції інсуліну [8].

При додаванні до раціону тварин ДГ2-ДГ4 магній цитрату, активність Г-6-ФДГ у підшлунковій залозі достовірно зростала у тварин ДГ2 і ДГ4 стосовно тварин ДГ1 з ЕЦД. Відомо, що суттєвим фактором регуляції активності Г-6-ФДГ є співвідношення NADP/NADPH у клітині, оскільки NADPH – сильний конкурентний інгібітор цього ензиму [10]. Як регуляторний фермент Г-6-ФДГ перебуває під гормональним і метаболітним контролем. Серед багатьох гормонів, які регулюють активність Г-6-ФДГ, інсулін особливо важливий [11]. Ми спостерігали зміну активності ЛДГ у підшлунковій залозі тварин: тенденцію до зростання (на 11%) у ДГ3 та вірогідне зростання у ДГ2 і ДГ4 відносно тварин ДГ1.

Нормалізація показників активності досліджуваних ензимів вуглеводного обміну може бути пов'язана з достатнім надходженням магнію в організм. Відомо, що магній залучений у процеси регуляції передачі сигналів від інсуліну, фосфорилування тирозинової кінази інсулінового рецептора, інсулін-опосередкованого поглинання глюкози клітинами [3]. Магній може змінювати чутливість тканин до інсуліну шляхом впливу на зв'язування інсуліну з його рецепторами, на активність рецептора після зв'язування або через вплив на внутрішньоклітинну передачу й обробку сигналів [12].

Враховуючи викладене, перспективи подальших досліджень у цьому напрямі вбачаємо у вивченні впливу магній цитрату як засобу для попередження виникнення ускладнень цукрового діабету, що дасть можливість розробити нові терапевтичні засоби для профілактики й лікування цього захворювання.

ВИСНОВКИ

1. За умов експериментального цукрового діабету активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази знижується в тканинах печінки, скелетних м'язів і підшлункової залози, а активність лактатдегідрогенази знижується в тканинах печінки й підшлункової залози і зростає в скелетних м'язах.
2. Застосування магній цитрату в дозах 100-, 250- і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла приводить до підвищення глюкозо-6-фосфатдегідрогенної активності в тканинах скелетних м'язів, печінки та підшлункової залози щурів.
3. Встановлено зростання активності лактатдегідрогенази в тканинах печінки й підшлункової залози та зниження – у скелетних м'язах щурів за впливу магній цитрату в дозах 100-, 250- і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла.

ЛІТЕРАТУРА

1. Sales C. R. Magnesium and diabetes mellitus: Their relation / C. R. Sales, L.D.F.C. Pedrosa // *Clinical Nutrition*. – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 554–562.
2. Barbagallo M. Magnesium metabolism in insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus / [M. Barbagallo, L. J. Dominguez, V. Brucato et al.] // *New Perspectives in Magnesium Research*. – London: Springer-Verlag, 2007. – P. 213-223.
3. Barbagallo M. Magnesium and type 2 diabetes / M. Barbagallo, L. J. Dominguez // *World J Diabetes*. – 2015. – Vol. 6, Is. 10. – P. 1152-1157.
4. Mooradian A. D. Selected vitamins and minerals in diabetes / [A.D. Mooradian, M. Failla, B. Hoogwerf, M. Maryniuk et al.] // *Diabetes care*. – 1994. – Vol. 17, № 5. – P. 464-479.
5. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.]; за ред. В. В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 761 с.
6. Функціонування деяких ключових ферментів вуглеводного обміну у щурів за умов експериментального цукрового діабету 2-го типу / [Т. І. Галенова, Н. Г. Ракша, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко] // *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія*. – 2011. – № 2. – С. 13-21.
7. Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптациях млекопитающих Карелии / [А. Р. Унжаков, В. А. Илюха, Н. В. Мацук, В. В. Белкин] // *Экология. Экспериментальная генетика и физиология. Труды Карельск. науч. центра РАН*. – 2007. – Вып. 11. – С. 118-126.
8. International Textbook of Diabetes Mellitus / Defronzo R.A., Ferrannini E., Zimmet P., Alberti G. // Chichester: John Wiley. – 2015. – Vol. 1-2 – 1240 p.
9. Кіхтяк О. П. Особливості показників вуглеводного обміну при цукровому діабеті за умов коригуючої фітотерапії.(експериментально-клінічне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / Кіхтяк Олеся Павлівна. – Тернопіль, 2002. – С. 19.
10. Северин Е. С. Биохимия: учеб. для вузов // Е.С. Северина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2003. – 779 с.

11. Макух Є. Особливості впливу інсуліну, ацетату і цитрату натрію на окремі реакції пентозофосфатного шляху й обміну глутатіону в крові корів / Є. Макух, І. Головацький // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол.– 2002. – Вип. 31. – С. 34-38.
12. De Valk H. W. Magnesium in diabetes mellitus / H. W. De Valk // The Netherlands journal of medicine. – 1999. – Vol. 54, № 4. – P. 139-146.

REFERENCES

1. Sales C.R. Magnesium and diabetes mellitus: Their relation / C.R. Sales, L.D.F.C. Pedrosa // Clinical Nutrition. – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 554–562.
2. Barbagallo M. Magnesium metabolism in insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus / [M. Barbagallo, L.J. Dominguez, V. Brucato et al.] // New Perspectives in Magnesium Research. – London: Springer-Verlag, 2007. – P. 213-223.
3. Barbagallo M. Magnesium and type 2 diabetes / M. Barbagallo, L.J. Dominguez // World J Diabetes. – 2015. – Vol.6, Is.10. – P. 1152-1157.
4. Mooradian A.D. Selected vitamins and minerals in diabetes / [A.D. Mooradian, M. Failla, B. Hoogwerf, M. Maryniuk et al.] // Diabetes care. – 1994. – Vol.17, № 5. – P. 464-479.
5. Laboratorni metodi doslidzhen' u biologii, tvarinnictvi ta veterinarnij medicini : dovidnik / [V. V. Vlizlo, R. S. Fedoruk, I. B. Raticz ta in.]; za red. V.V. Vlizla. – L'viv, SPOLOM, 2012. – 761 s.
6. Funkcionuvannja dejakih ključovih fermentiv vuglevodnogo obminu u shhuriv za umov eksperimental'nogo cukrovogo diabetu 2-go tipu / [T.I. Galenova, N.G. Raksha, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko] // Eksperim. ta klinich. fiziologija i biohimija. – 2011. – № 2. – S. 13-21.
7. Rol' izofermentov laktatdegidrogenazy v adaptacijah mlekopitajushhij Karel'ii / [A.R. Unzhakov, V.A. Iljuha, N.V. Macuk, V.V. Belkin] // Jekologija. Jeksperimental'naja genetika i fiziologija. Trudy Karel'sk. nauch. centra RAN. – 2007. – Vyp. 11. – S. 118–126.
8. International Textbook of Diabetes Mellitus / Defronzo R.A., Ferrannini E., Zimmet P., Alberti G. // Chichester: John Wiley, 2015. – Vol. 1-2 – 1240 p.
9. Kihťjak O. P. Osoblivosti pokaznikiv vuglevodnogo obminu pri cukrovomu diabete za umov korigujuchoi fitoterapii.(eksperimental'no-klinichne doslidzhennja): avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stupenja kand. med. nauk : spec. 14.03.04 «Patologichna fiziologija» / Kihťjak Olesja Pavlivna. – Ternopil', 2002. – S.19.
10. Severin E. S. Biohimija: ucheb. dlja vuzov // E.S. Severina. – M. : GJeOTAR-Media, 2003. – 779 s.
11. Makuh Є. Osoblivosti vplivu insulinu, acetatu i citratu natriju na okremi reakcii pentozofosfatnogo shljahu j obminu gljutationu v krvi koriv / Є. Makuh, I. Golovac'kij // Visnik L'viv. un-tu. Serija biol.– 2002. – Vip. 31. – S.34-38.
12. De Valk H.W. Magnesium in diabetes mellitus / H.W. De Valk // The Netherlands journal of medicine. – 1999. – Vol. 54, № 4. – P. 139-146.