DOI: 10.26693/jmbs02.04.189
УДК 546.47; 678.048

Слівінська О. М.

ВПЛИВ ЦИТРАТУ ЦИНКУ НА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ У ПЕЧІНЦІ ТА ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДІАБЕТУ

Інститут біології тварин НААН, Львів

ВНКЗ ЛОР «Львівський інститут медсестринської і лабораторної медицини ім. Андрія Крупинського»

rudasliva@ukr.net

У статті представлені дані щодо дії цитрату цинку на активність ензимів антиоксидантної системи та вміст відновленого глутатіону і продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах печінки та підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету індукованого стрептозотоцином.

Отримані результати вказують, що цитрат цинку, який додавали до раціону щурів, зумовлює послаблення процесів пероксидації ліпідів у досліджуваних тканинах за рахунок активації системи антиоксидантного захисту. Завдяки його антиоксидантним властивостям він може використовуватися як компонент біологічно активних добавок з метою профілактики діабету.

Ключові слова: щурі, антиоксидантна система, цукровий діабет, цитрат цинку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Вивчити біологічні особливості дії цитратів мікроелементів в різні періоди онтогенезу тварин» (№ держ. реєстрації 0116U001407, шифр 35.00.01.02Ф), та «Дослідити особливості впливу цитратів цинку, хрому та магнію на вуглеводний обмін та антиоксидантний статус в організмі тварин» (шифр 35.00.01.02.01Ф).

Вступ. Цинк бере участь у багатьох молекулярних внутрішньоклітинних процесах і характеризується регуляторним впливом на проліферацію, диференціацію та функціональну активність різних типів клітин. Тісний зв'язок цинку з гормонами і ферментами пояснює його вплив на вуглеводний, жировий і білковий обміни речовин, на окисно-відновні процеси, на синтетичну здатність печінки. Вважається, що у підтриманні гомеостазу цинку бере участь і підшлункова залоза [17], вивільняючи цинк у кишковий тракт, звідки відбувається реабсорбція мікроелемента в періоди його дефіциту [14]. Установлено, що за умов діабету порушується обмін цинку, особливо в β-клітинах панкреатичних острівців [13]. Розвиток діабету супроводжується дегрануляцією інсулоцитів і втратою цинку [10, 11]. Це явище слугувало підкріпленням положення про його роль в інкреторній функції підшлункової залози.

Однією з важливих функцій цинку є участь в системі антиоксидантного захисту організму [9, 18]. Цинк здатний активувати синтез у печінці Cu/Zn - залежної СОД [15]. Він може конкурувати з ферумом і купрумом, як антагоністами, за зв'язки з мембранами клітин і зменшувати утворення вільних радикалів, тим самим здійснюючи пряму антиоксидантну дію [20].

Тому **метою** даних **досліджень** було з'ясувати вплив різних кількостей цинку на стан процесів пероксидного окислення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту у печінці та підшлунковій залозі щурів за експериментального цукрового діабету індукованого стрептозотоцином.

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження проведені на білих лабораторних щурах, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН. Робота виконана з дотриманням рекомендацій Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (Київ, 2006).

Тварини масою тіла від 150 до 170 г були розділені на чотири групи: I група – контрольна, II, III і IV – дослідні. Тварини I і II груп споживали виключно основний раціон. Тваринам III і IV груп протягом місяця до основного раціону додавали розчин цитрату цинку в кількостях 20 і 50 мг Zn/кг маси тіла. У тварин II, III і IV груп на тлі 24-ох годинного голодування був викликаний експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину ("Sigma", США) з розрахунку 45 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 дослідження були гомогенати тканин печінки та підшлункової залози щурів. Визначали вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію [1]. Концентрацію ТБК-активних продуктів вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою [5]. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.1.15.1.) визначали за методом, принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами [4]. Активність глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону [7]. Активність каталази (КТ, КФ 1.11.1.6) визначали за допомогою здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий кольоровий комплекс [6]. Активність глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) визначали за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH [3]. Вміст відновленого глутатіону визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс, 2-нітробензойною кислотою [3]. Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою комп’ютерної програми «Statistika». Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Досліджуючи вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів було виявлено зростання їх вмісту у печінці та підшлунковій залозі тварин II групи порівняно з контрольною групою. Зокрема, у підшлунковій залозі вміст ГПЛ вірогідно зріс у 2 рази стосовно I групи (**табл. 1**). Можливо це пов’язано з активацією процесів ліпопероксидації за умов гіперглікемії. Проте за умов додавання цитрату цинку було відмічено вірогідне зниження вмісту ГПЛ в 1,2 рази у підшлунковій залозі щурів IV дослідної групи, однак зростання в 1,4 рази у III групі відносно II.

При визначенні вмісту ТБК-активних продуктів було відмічено вірогідне їх зростання в тканинах печінки та підшлункової залози щурів II дослідної групи відносно контрольної групи, відповідно в 1,4 і 1,9 раза. Високий вміст продуктів ПОЛ у тканинах щурів за експериментального цукрового діабету, очевидно, пов’язаний з послабленням зв’язування інсуліну з рецепторами на поверхні клітин. Це призводить до гіперболічної дії антагоніста інсуліну – кортизолу, який посилює процеси пероксидації ліпідів і пригнічує функціонування системи антиоксидантного захисту. Однак в тканинах щурів тварин III та IV груп спостерігалося зниження вмісту ТБК-активних продуктів. Зокрема, їх вміст знижувався у печінці тварин IV дослідної групи в 1,4 рази та підшлунковій залозі тварин III та IV груп, відповідно в 1,3 і 2,5 раза стосовно II групи. Це може бути пов’язано з здатністю цинку стимулювати експресію металопротеїнів у тканині підшлункової залози, які, як відомо, акумулюють гідроокисні радикали та можуть потенційно запобігти деструкції бета-клітин.

Антиоксидантна система (АОС) організму захищає його тканини і клітини від ушкодження вільними радикалами, які безперервно утворюються в живому організмі, а також сприяє відновленню функціонування обмінних процесів. Процеси ПОЛ та функціонування АОС добре збалансовані та працюють за принципом зворотного зв’язку: збільшення рівня антиоксидантів призводить до гальмування вільнорадикального окиснення, а це, у свою чергу, змінює властивості самих ліпідів: у них з’являються легкоокисні фракції, що прискорює процес ПОЛ. При цьому витрачається багато ендогенних антиоксидантів і система повертається до вихідного рівня. Така динамічна рівновага ПОЛ та АОС у біологічних мембранах і рідинах притаманна всім рівням організації живих систем, і є одним із основних показників нормального гомеостазу.

Таблиця 1 – Вміст продуктів ПОЛ у тканинах щурів з ЕЦД та за пливу цитрату цинку в кількостях 20 і 50 мг/кг маси тіла (M±m; n=7)

	I група	II група	III група	IV група
Гідропероксиди ліпідів, ОЕ/ г				
Печінка	0,16±0,010	0,24±0,061	0,15±0,004	0,21±0,026
Підшлункова залоза	0,36±0,029	0,71±0,040***	1,03±0,059$^{***\#\#\#}$	0,58±0,016$^{***\#}$
ТБК-активні продукти, нмоль/ г				
Печінка	3,56±0,154	4,88±0,309**	4,23±0,328	3,54±0,049$^{\#\#\#}$
Підшлункова залоза	1,52±0,053	2,83±0,024***	2,13±0,040$^{***\#\#\#}$	1,14±0,037$^{***\#\#\#}$

Примітки: * статистично вірогідні різниці між тваринами II, III і IV груп та тваринами I (контрольної) групи:
* — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001; # —статистично вірогідні різниці між тваринами III і IV груп та тваринами II групи : #— p < 0,05; ## — p < 0,01; ### — p < 0,001.

Таблиця 2 – Активність супероксиддисмутази та каталази у тканинах щурів з ЕЦД та за пливу цитрату цинку в кількостях 20 і 50 мг/кг маси тіла (M±m; n=7)

	I група	II група	III група	IV група
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну				
Печінка	41,88±1,25	39,37±1,11	55,58±3,95$^{**\#\#}$	65,04±5,11$^{***\#\#\#}$
Підшлункова залоза	38,12±2,25	15,84±0,65***	29,70±1,47$^{**\#\#\#}$	34,31±1,20$^{\#\#\#}$
Каталаза, ммоль/хв•мг протеїну				
Печінка	7,57±0,37	8,77±0,48	7,42±0,40	9,72±0,09***
Підшлункова залоза	4,07±0,24	5,29±0,43***	6,27±0,11***$^{\#\#}$	8,56±0,13***$^{\#\#\#}$

Примітки: * статистично вірогідні різниці між тваринами II, III і IV груп та тваринами I (контрольної) групи:
* — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001; # —статистично вірогідні різниці між тваринами III і IV груп та тваринами II групи : #— p < 0,05; ## — p < 0,01; ### — p < 0,001.

Головна роль в антиоксидантному захисті клітин відводиться – супероксиддисмутазі, яка, дисмутуючи супероксидний аніонрадикал, перетворює його в менш реакційноспроможний пероксид гідрогену. СОД безпосередньо забезпечує обрив вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів на так званій «нульовій» стадії вільнорадикального окислення [8, 12]. Відомо, що активність антиоксидантних ензимів за умов хронічної гіперглікемії може знижуватися внаслідок їх неензиматичного глікозилювання [8, 12].

Дані наших досліджень свідчать про вірогідне зниження активності СОД в 2,4 раза у підшлунковій залозі щурів II групи за ЕЦД та невірогідне зниження в тканині печінки. Активність ензиму вірогідно зростала у печінці тварин III і IV груп та знижувалася у підшлунковій залозі тварин III групи у порівнянні з показниками тварин I групи. У порівнянні з показниками активності СОД у тварин II групи виявлено достовірне підвищення активності цього ензиму у тварин III групи, зокрема у печінці – на 41%, підшлунковій залозі – на 87%, а в IV групі, відповідно на 65% і 116%. Дану закономірність можна пояснити тим, що СОД – ензим, який у своєму складі містить цинк, тому навіть за ЕЦД, але при додатковому випоюванні сполуки цинку встановлено підвищення його активності.

Активність каталази в підшлунковій залозі щурів дослідних груп вірогідно зростала, зокрема, спостерігалося вірогідне зростання активності КТ у тварин II, III і IV груп, відповідно в 1,3 1,5 і 2,1 раза у порівнянні з показниками контрольної групи. У тварин III і IV груп спостерігалося зростання активності ензиму, відповідно в 1,2 і 1,6 раза у порівнянні з показниками II групи (**табл. 2**).

У печінці виявлено вірогідне зростання активності КТ лише в IV групі в 1,3 раза у порівнянні з показниками тварин I групи.

Функціонування різних компонентів АОС тісно пов'язане з окремими ланками клітинного метаболізму. Насамперед це стосується активності глутатіонпероксидази, ключового ензиму АОС в організмі тварин. Так, у II групі спостерігалося вірогідне зниження даного ензиму відносно I групи (контрольної) в тканині печінці – в 1,4 раза та у підшлунковій залозі – в 1,3 раза. Крім цього, у печінці тварин виявлено зниження активності цього ензиму в 1,3 раза – в III групі та зростання в 1,2 раза – у IV групі, порівняно із контрольною групою (**табл. 3**).

Таблиця 3 – Активність глутатіонної системи в тканинах щурів з ЕЦД та за пливу цитрату цинку в кількостях 20 і 50 мг/кг маси тіла (M±m; n=7)

	I група	II група	III група	IV група
Активність глутатіонпероксидази, мкмоль/хв. мг протеїну				
Печінка	9,02±0,34	6,37±0,21***	6,99±0,44**	11,07±0,44$^{**\#\#\#}$
Підшлункова залоза	31,31±1,50	24,5±1,21**	30,02±1,93$^{\#}$	29,29±0,84$^{\#\#}$
Активність глутатіонредуктази, мкмоль/хв. мг протеїну				
Печінка	1,53±0,12	0,82±0,130**	0,81±0,063***	1,86±0,15$^{\#\#\#}$
Підшлункова залоза	0,86±0,037	0,61±0,016***	0,73±0,053	0,75±0,023$^{*\#\#\#}$
Вміст відновленого глутатіону, ммоль/г				
Печінка	4,60±0,33	1,73±0,06**	6,33±0,269$^{**\#\#\#}$	5,41±0,374$^{\#\#\#}$
Підшлункова залоза	1,19±0,07	0,59±0,02***	0,74±0,019$^{***\#\#\#}$	0,92±0,054$^{**\#\#\#}$

Примітки: * статистично вірогідні різниці між тваринами II, III і IV груп та тваринами I (контрольної) групи:
* — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001; # —статистично вірогідні різниці між тваринами III і IV груп та тваринами II групи : #— p < 0,05; ## — p < 0,01; ### — p < 0,001.

Однак, стосовно тварин II групи з ЕЦД виявлено зростання активності ГП у печінці тварин IV групи в 1,7 раза та підшлунковій залозі III і IV груп в 1,2 раза. Ці дані свідчать про пряму залежність між вмістом цинку в раціоні та активністю ГП у тканинах щурів.

Глутатіонредуктаза – широко поширений флавінових ензим, що підтримує високу внутрішньоклітинну концентрацію відновленої форми глутатіону. Для відновлення окисненого глутатіону ГР в якості донорів гідрогену використовує НАДФН, який утворюється в пентозофосфатному шляху у глюкозо-6-фосфатдегідрогеназній реакції [2].

При дослідженні активності ГР в тканині печінки цей ензим був вірогідно нижчий майже в 2 рази відносно контролю в II та III групах (**табл. 3**). Проте, у тварин IV дослідної групи у тій же тканині активність ГР була вища у 2,2 раза порівняно з II (діабетичною) групою.

Активність ГР у підшлунковій залозі вірогідно менша в II групі на 29,3% та IV – на 12,7% відносно контрольної групи. Однак, порівняно з II групою активність цього ензиму у IV групі більша в 1,2 раза.

Як відомо, цинк відіграє важливу роль у діяльності підшлункової залози, процесах зв'язування інсуліну з гепатоцитами, синтезі ліпопротеїнів. Внаслідок його нестачі порушується толерантність організму тварин до глюкози.

З джерел літератури відомо, що вміст відновленого глутатіону зменшується порівняно з нормою за умов стрептозотоцинового діабету [19]. Подібне зниження вмісту відновленого глутатіону ми спостерігали у печінці (в 2,6 рази) та підшлунковій залозі (в 2 рази) щурів II групи порівняно з контрольною. У той час відмічено вірогідне зростання вмісту відновленого глутатіону у печінці тварин III групи – в 3,6 раза та в IV групи – у 3,1 раза, а також у підшлунковій залозі тварин III групи – в 1,2 раза та IV групи – в 1,5 раза порівняно до II групи.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Отримані результати вказують, що цитрат цинку, який додавали до раціону щурів, зумовлює послаблення процесів пероксидації ліпідів у досліджуваних тканинах за рахунок активації системи антиоксидантного захисту. Завдяки його антиоксидантним властивостям він може використовуватися як компонент біологічно активних добавок з метою профілактики діабету, що і стане метою подальших досліджень.

References

1. *Patent 1084681 SSSR*, MKI G 01N 33/48. Sposob opredeleniya gidroperekisey lipidov v biologicheskikh tkanyakh / Mironchik VV (SSSR). № 3468369/2813; zayavl. 08.07.82; opubl. 07.04.84, byul. № 13. [Russian].
2. Ataullakhanov FI, Zhabotinskiy AM, Pichugin AB. Zavisimost skorosti funktsionirovaniya pentoznogo puti v eritrotsitakh ot stepeni vosstanovlennogo glutationa. *Biokhimiya*. 1981; 46 (3): 530-40. [Russian].
3. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Makar IA, ta in. *Dovidnik: Fiziologo-biokhimichni metodi doslidzhen u biologiyi, tvarinnitstvi ta veterinarniy meditsini*. Lviv: Vidavnitstvo «VMS», 2004. 399 s. [Ukrainian].
4. Dubinina EE, Salnikova LA, Efimova LF. Aktivnost i izofermentnyy spektr superoksiddismutazy eritrotsitov i plazmy krovi cheloveka. *Laboratornoe delo*. 1983; 10: 30-3. [Russian].
5. Korobeynikova EN. Modifikatsiya opredeleniya POL v reaktsii s TBK. *Laboratornoe delo*. 1989; 7: 8-10. [Russian].
6. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokarev VE. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-8. [Russian].
7. Moin VM. Prostoy i spetsificheskiy metod opredeleniya aktivnosti glutationperoksidazy v eritrotsitakh. *Laboratornoe delo*. 1986; 12: 724-7. [Russian].
8. Stefanov AV, Derimedved LV, Churilova IV, i dr. *Klinikoeksperimentalnoe obosnovanie primeneniya preparatov superoksiddismutazy v meditsine*. Kharkov: Izd-vo NFaU «Zolotye stranitsy», 2004. 288 s. [Russian].
9. Bun SD, Guo YM, Guo FC, Ji FJ, Cao H. Influence of organic zinc supplementation on the antioxidant status and immune responses of broilers challenged with Eimeria tenella *Poultry Science*. 2011; 90 (6): 1220-6. DOI: 10.3382/ps.2010-01308.
10. Eizirik DL, Darville MI. Beta-cell apoptosis and defence mechanisms: lesions from type 1 diabetes. *Diabetes*. 2001; 50 (Suppl 1): 64–9.
11. Greenblatt HM, Feinberg H, Tucker PA, Shoham G. Carboxipeptidase A: native, zinc-removed and mercury- replaced forms. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1998; 54 (Pt 3): 289–305.
12. Recent Advances and Clinical Application. Abstracts. *International conference on Superoxide Dismutase.* Institut Pasteur. Paris, May 1-15, 1998. 125 p.
13. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61: 49–68. DOI: 10.1007/s00018-003-3148-y.
14. Krebs NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr.* 2000; 130: 1374–7.
15. Kulikowska-Karpińska E, Moniuszko-Jakoniuk J. Lead and Zinc Influence on Antioxidant Enzyme Activity and Malondialdehyde Concentrations. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2001; 10 (3): 161-5.

16. Marcellini F, Giuli C, Papa R, et al. Zinc status, psychological and nutritional assessment in old people recruited in five European countries: Zincage study. *Biogerontology.* 2006; 7 (5-6): 339–45.
17. McClain CJ, The pancreas and zinc homeostasis. *J Lab Clin Med*. 1990; 116: 275–6.
18. Powell SR. The Antioxidant properties of zinc. *J Nutr*. 2000; 130: 1447S–54S.
19. Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12 (5): 3133–47. doi: 10.3390/ijms12053133
20. Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA. Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26: 704–13.

УДК 546.47; 678.048

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТ ЦИНКА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ В ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Сливинская А. Н.

Резюме. В статье представлены данные о действии цитрата цинка на активность энзимов антиоксидантной системы и содержание восстановленного глутатиона и продуктов перекисного окисления липидов в тканях печени и поджелудочной железе крыс при экспериментальном сахарном диабете индуцированным стрептозотоцином.

Полученные результаты указывают, что цитрат цинка, который добавляли в рацион крыс, вызывает ослабление процессов ПОЛ в исследуемых тканях за счет активации системы антиоксидантной защиты. Благодаря его антиоксидантным свойствам он может использоваться как компонент биологически активных добавок с целью профилактики диабета.

Ключевые слова: крысы, антиоксидантная система, сахарный диабет, цитрат цинка.

UDC 546.47; 678.048

Zinc Citrate Influence on Antioxidant Defence in Rats' Liver and Pancreatic Gland during Experimentally Diabetes

Slivinska O. M.

Abstract. The purpose of the article is to present data towards the zinc citrate action of on the activity of antioxidant system enzymes and the content of reduced glutathione and products of peroxide oxidation of lipids in liver and pancreatic tissues of rats under the condition of experimental streptozotocin – induced diabetes mellitus. The experiment was conducted on white laboratory rats, which were divided into four groups: I – the control group, II, III and IV – the experimental groups. Animals of the 3rd and 4th groups received zinc citrate solution in amount of 20 and 50 mg Zn/kg bodyweight dosage to a basic diet during a month. Experimental diabetes mellitus was induced in animals of all experimental groups after 24-hour fasting.

Antioxidant defence indicators were determined in the homogenates of the liver and pancreas of the rats. There was a decrease in the activity of enzymes AOC and the content of reduced glutathione in tissues of animals of the group II compared to the group I – control, but in animals of groups III and IV the growth of the studied indices compared to the control group was observed.

Researching the content of lipid hydroperoxides and TBC-active products in tissues of rats, the growth of their content in animals of the experimental group II compared to the control group was noticed. At the same time, in animals of III and IV groups, the levels of these indices were normalized, indicating the activation of antioxidant processes under the action of zinc citrate.

The obtained results indicate that zinc citrate added to the diet of rats causes a decrease in lipid peroxidation processes in the studied tissues due to the activation of the antioxidant system. Due to its antioxidant properties, it can be used as a component of biologically active additives to prevent diabetes.

Keywords: rats, antioxidant system, diabetes mellitus, zinc citrate.

Стаття надійшла 12.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування