

## **ДІЯ ХРОМ ЦИТРАТУ НА ПРО/АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

**Р. Іскра, О. Слівінська**

*Інститут біології тварин НААН України  
вул. В.Стуса, 38, Львів 79034, Україна  
e-mail: iskra\_r@ukr.net*

Досліджували дію хром цитрату ( $C_6H_5CrO_7$ ) в кількостях 10 і 25 мкг Cr/кг маси тіла на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів і активність ензимів антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету. Встановлено, що за умов експериментального цукрового діабету в підшлунковій залозі щурів підвищувався вміст ТБК-позитивних продуктів пероксидного окиснення ліпідів і зростала супероксиддисмутазна активність, однак каталазна, глутатіонредуктазна активності та вміст відновленого глутатіону знижувалися щодо аналогічних показників у тварин контрольної групи. Введення до раціону щурів хром цитрату в дозі 10 мкг Cr/кг маси тіла призводило до зростання глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної активностей і вмісту відновленого глутатіону в підшлунковій залозі, в той час як введення цієї солі в дозі 25 мкг Cr/кг маси тіла призводило до зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, супероксиддисмутазної активності, проте до підвищення каталазної, глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної активностей і вмісту відновленого глутатіону стосовно показників у тварин з експериментальним діабетом.

*Ключові слова:* щурі, підшлункова залоза, діабет, антиоксидантна система, хром.

Забезпечення контролю рівноваги про/антиоксидантного статусу здійснюється за рівнем у клітинах організму активних форм кисню (АФО). Надлишок АФО призводить до виникнення оксидативного стресу, що лежить в основі одного з найважливіших механізмів регулювання різноманітних захворювань [19, 20], у т.ч. цукрового діабету.  $\beta$ -клітини підшлункової залози особливо чутливі до змін внутрішньоклітинних рівнів АФО [17, 23]. Однією з причин оксидативного стресу в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози є гіперглікемія [10]. Стійка гіперглікемія при цукровому діабеті посилює автоокиснення глюкози [23], активацію протеїнкінази-С та інтенсифікацію перетворення глюкози шляхом гліколізу [10]. Відомо про зв'язок між оксидативним стресом і порушенням функцій  $\beta$ -клітин при діабеті II типу в людей [10]. Оксидативний стрес при діабеті корелює зі зменшенням антиоксидантного статусу організму, що може додатково посилити шкідливий вплив вільних радикалів. Було встановлено нижчий рівень активності антиоксидантних ензимів при діабеті в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози порівняно з іншими тканинами [23]. Крім цього, виявлено апоптоз  $\beta$ -клітин підшлункової залози [11, 15] і зниження транскрипції гена інсуліну [18] внаслідок глікозилювання опосередкованого АФО. Однак було показано, що лікування антиоксидантами пригнічує апоптоз  $\beta$ -клітин діабетичних мишей, що зумовлює збереження їхніх функцій [16]. Тому актуальними є дослідження, які стосуються пошуку нових сполук, що здатні стимулювати антиоксидантний статус організму за цукрового діабету. Мікроелемент хром підсилює дію інсуліну в складі хромодуліну – специфічного протеїну, який

використовується в активації рецепторів цього гормону [4, 5]. Деякими дослідниками було виявлено, що високі дози хрому проявляють антидіабетичну, анаболічну й антиоксидантну дію [12, 22]. Важливим є застосування хрому у вигляді цитратів – солей лимонної кислоти, які синтезуються в організмі людини й тварин і беруть участь у циклі Кребса. Тому метою наших досліджень було з'ясувати вплив хром цитрату в різних концентраціях на про/антиоксидантний статус підшлункової залози щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

#### Матеріали та методи

Дослідження проведені на 28 білих лабораторних щурах, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 150 до 170 г, та були розділені на чотири групи: I група – контрольна, II, III і IV – дослідні. У тварин дослідних груп на тлі 24-годинного голодування було викликано експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозоточину ("Sigma", США) з розрахунку 35 мг/кг маси тіла. Гіперглікемію виявляли шляхом вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра ("Gamma-M"). Тваринам III і IV дослідних груп, на відміну від II групи, до основного раціону протягом місяця від початку досліджень додавали розчин хром цитрату в кількостях 10 і 25 мкг Cr(III)/кг м.т, з метою запобігання виникненню експериментально-індукованого діабету.

Матеріалом для дослідження була підшлункова залоза щурів, в гомогенатах якої визначали вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою з подальшим внесенням у середовище тіоціанату амонію [1]. Концентрацію ТБК-позитивних продуктів вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою [6]. Супероксиддисмутазну активність (СОД, КФ 1.1.15.1) визначали за методом, принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами [3]. Глутатіонпероксидазну активність (ГП, КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону [8]. Каталазну активність (КТ, КФ 1.11.1.6) визначали за допомогою здатності пероксиду водню утворювати зі солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [7]. Глутатіонредуктазну активність (ГР, КФ 1.6.4.2) визначали за швидкістю відновлення глутатіону за наявності NADPH [2]. Вміст відновленого глутатіону визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс, 2-нітробензойною кислотою [2]. Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми "Statistika". Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

#### Результати і їхнє обговорення

У підшлунковій залозі щурів за умов експериментального діабету (II дослідна група) виявлено зростання вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів щодо тварин контрольної групи, однак вірогідно зростав на 20,3% лише вміст ТБК-позитивних продуктів (див. таблицю). За послабленого функціонування системи антиоксидантного захисту при діабеті  $\beta$ -клітини підшлункової залози чутливі до негативної дії вільних радикалів Оксигену [14]. За дії високих рівнів АФО відбувається зниження експресії мРНК інсуліну та зменшення його секреції, це зумовлює посилення дії антагоніста інсуліну кортизолу, що стимулює процеси пероксидації ліпідів [23].

Встановлено, що введення хром цитрату до раціону щурів у кількості 10 і 25 мкг Cr/кг маси тіла призводило до зниження вмісту продуктів ПОЛ у підшлунковій залозі. Зокрема, спостерігалася тенденція до зниження вмісту ГПЛ у підшлунковій залозі тварин III та IV дослідних груп, у той час як вміст ТБК-позитивних продуктів вірогідно знижувався

у тварин IV групи на 21% щодо II дослідної групи. Наші дослідження узгоджуються з даними інших авторів, у яких добавки хрому до раціону тварин призводять до пригнічення процесів пероксидації ліпідів [12].

Вміст продуктів ПОЛ, відновленого глутатіону й активність ензимів антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів за експериментального діабету та впливу хром цитрату в концентраціях 10 і 25 мкг Cr(III)/кг маси тіла ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )

Показники	Групи тварин			
	I	II	III	IV
Гідропероксидація ліпідів ОЕ/ г тканини	0,056±0,007	0,074±0,006	0,064±0,008	0,054±0,008
ТБК-позитивні продукти, нмоль/ г тканини	1,627±0,094	1,957±0,076*	1,715±0,082	1,545±0,163 <sup>###</sup>
СОД, ум. од /мг протеїну	32,73±1,43	46,47±1,55***	46,30±1,48***	40,56±2,12 <sup>###</sup>
Каталаза, ммоль/хв*мг протеїну	7,927±0,689	4,56±0,417**	6,37±0,722	7,183±0,437 <sup>###</sup>
ГП, нмоль/хв*мг протеїну	26,64±2,239	22,34±0,895	26,07±1,406 <sup>#</sup>	26,73±1,083 <sup>###</sup>
ГР, мкмоль/хв*мг протеїну	5,67±0,541	3,14±0,361**	4,37±0,432 <sup>###</sup>	4,79±0,356 <sup>###</sup>
ВГ, ммоль/г тканини	0,097±0,005	0,059±0,003***	0,087±0,005 <sup>###</sup>	0,095±0,005 <sup>###</sup>

**Примітка:** \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  - вірогідність показників II, III, IV груп порівняно з I групою; # $p < 0,05$ , <sup>###</sup> $p < 0,01$ , <sup>####</sup> $p < 0,001$  - вірогідність показників III, IV груп порівняно з II групою.

СОД є одним з найважливіших ензимів антиоксидантної системи організму, який здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на молекули пероксиду гідрогену, які є менш реакційно здатними. Досліджуючи ензиматичну активність у підшлунковій залозі щурів було відмічено вірогідне зростання СОД-ної активності в II дослідній групі на 41,9% щодо контролю. Були також повідомлення інших дослідників про підвищення рівня АФО і СОД-ної активності за ЕЦД [13, 24]. Таке ж зростання СОД-ної активності відбувалося в підшлунковій залозі тварин III та IV дослідних груп щодо контролю, відповідно 41,4 та 25,2%. Однак у підшлунковій залозі тварин IV дослідної групи відмічено вірогідне зниження СОД-ної активності на 12,7% порівняно з ензиматичною активністю у тварин II групи з цукровим діабетом.

Знешкодження пероксиду гідрогену, що утворюється в результаті дисмутації супероксидного радикала здійснює каталаза. У наших дослідженнях виявлено вірогідне зниження каталазної активності в підшлунковій залозі тварин II дослідної групи на 42,5% порівняно з контролем. Проте у тварин IV дослідної групи ензиматична активність зростала на 57,5% стосовно II групи.

При оксидативному стресі особливо важливою є глутатіонова система, яка безпосередньо знешкоджує АФО [9]. Активність ГП залежить від вмісту відновленого глутатіону, внутрішньоклітинну концентрацію якого підтримує ГР. Функціонування ж ГР, у свою чергу, визначається рівнем відновлених нікотинамідних коферментів. За умов ЦД спостерігається енергетичне виснаження організму, яке зумовлює виникнення дефіциту енергетичних субстратів, що впливає на ефективність захисних систем. ГП-на активність у підшлунковій залозі тварин III та IV дослідних груп вірогідно зросла, відповідно на 16,7 і 19,7%, щодо ензиматичної активності у тварин II групи з експериментальним діабетом.

При дослідженні ГР-ної активності в підшлунковій залозі щурів II дослідної групи було відмічено вірогідне її зниження на 44,6% щодо контролю (див. таблицю). Однак у підшлунковій залозі тварин III та IV груп виявлено вірогідне зростання даної ензиматичної активності, відповідно на 39,2 та 52,5% щодо II дослідної групи.

Встановлено зниження вмісту відновленого глутатіону в підшлунковій залозі тварин II дослідної групи на 39,2% щодо контролю. Що стосується III та IV дослідних груп, то тут спостерігається підвищення рівня відновленого глутатіону, відповідно на 47,4 і 61,0%

стосовно II групи. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які вказують на активацію глутатіонової системи антиоксидантного захисту при додатковому введенні сполук хрому до раціону тварин [12, 22].

Таким чином встановлено, що за умов ЕЦД у підшлунковій залозі щурів виявлено підвищення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів і зростання супероксиддисмутазної активності, однак зниження каталазної, глутатіонредуктазної активностей і вмісту відновленого глутатіону щодо тварин контрольної групи. Отримані результати свідчать про згубний вплив, який спричиняє комулювання супероксидних радикалів ( $O_2^-$ ) і гідроген пероксидів ( $H_2O_2$ ) у клітинах підшлункової залози щурів за ЕЦД [21]. Введення до раціону щурів хром цитрату в дозах 10 і 25 мкг Cr/кг маси тіла призводило до зниження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів і супероксиддисмутазної активності, проте до зростання каталазної, глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної активностей та вмісту відновленого глутатіону стосовно їхнього рівня у тварин II групи з ЕЦД. Зміни активності антиоксидантних ензимів у підшлунковій залозі щурів за дії сполуки хрому, очевидно, зумовлені опосередкованою дією елемента через гормон інсулін на ці ензими.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. А.с. № 1084681. СССР, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В. В. (СССР). Опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.
2. Влізко В. В., Федорук Р. С., Макар І. А. та ін. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: ВМС, 2004. 399 с.
3. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. 1983. № 10. С. 30–33.
4. Іскра Р. Я., Янович В. Г. Біохімічні механізми дії хрому в організмі людини і тварини // Укр. біохім. журнал. 2011. Т. 83. С. 5–12.
5. Іскра Р. Я. Методи оцінки системи антиоксидантного захисту організму тварин за дії сполук хрому: метод. рекомендації. Львів, 2011. 35 с.
6. Коробейникова Э. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. 1989. № 7. С. 8–10.
7. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.
8. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 124–127.
9. Сибірня Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу: навч.-метод. посіб. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2006. С. 60.
10. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // Nature. 2001. P. 813–820.
11. Del Guerra S., Lupi R., Marselli L. et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes // Diabetes. 2005. P. 727–735.
12. Guerrero-Romero F., Rodriguez-Moran M. Complementary therapies for diabetes: The case for chromium, magnesium, and antioxidants // Archives of Medical Research. 2005. P. 250–257.
13. Gorey K. C., Soresso D., Moak S. A. Comparison of superoxide dismutase activities in isolated rat and guinea pig islets of langerhans // Horm. Metab. Res. 1993. P. 649–650.
14. Grankvist K., Markud S., Toijedahl I. B. Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes // Nature. 1981. P. 158–160.

15. Kaneto H., Fuji J., Myint T. et al. Reducing sugars triggers oxidative modification and apoptosis in pancreatic  $\beta$  - cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction // *Biochem. J.* 1996. P. 855–863.
16. Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J. et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic  $\beta$  - cells against glucose toxicity // *Diabetes.* 1999. P. 2398–2406.
17. Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues // *Free Radic. Biol. Med.* 1996. P. 463–466.
18. Matsuoka T., Kajimoto Y., Watada H. et al. Glycation – dependent, reactive oxygen species mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells // *J. Clin. Invest.* 1997. P. 144–150.
19. Panieri E., Gogvadze V., Norberg E. et al. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. P. 176–187.
20. Sato A., Okada M., Shibuya K. et al. Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells // *Stem Cell Res.* 2014. P.119–131.
21. Satheesh M. A., Pari L. Antioxidant effect of Boerhavia diffusa L in tissues of alloxan induced diabetic rats // *Indian. J. Exp. Biol.* 2004. Vol. 42. P. 989–992.
22. Suzan M. Mansour, Hala F. Zaki, Ezz-El-Din El-Denshary. Chromium picolinate and rosiglitazone improve biochemical derangement in a rat model of insulin resistance. Role of TNF- $\alpha$  and leptin // *Pharmacologia.* 2013. P. 186–196.
23. Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells // *Diabetes.* 1997. P. 1733–1742.
24. Uchigata Y., Yamamoto H., Kawamura A., Okamoto H. Protection by superoxide dismutase, catalase and poly (ADP – Ribose ) synthetase inhibitors against alloxan and streptozotocin induced islet DNA. Strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis // *J. Biol. Chem.* 1982. P. 6084–6088.

Стаття: надійшла до редакції 06.03.15

доопрацьована 06.07.15

прийнята до друку 11.09.15

## THE EFFECT OF CHROMIUM CITRATE ON PRO/ANTIOXIDANT STATUS OF RATS' PANCREAS UNDER THE CONDITION OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS

**R. Iskra, O. Slivinska**

*Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine*

*38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

*e-mail: iskra\_r@ukr.net*

The influence of Chromium citrate ( $C_6H_5CrO_7$ ) in a quantity of 10 and 25 mcg  $Cr^{3+}$ /kg body weigh on the content of lipid peroxidation products and the activity of antioxidant defense system enzymes in pancreas of rats under the condition of streptozotocin-induced diabetes mellitus was researched. It was established that MDA content, the activity of su-

peroxide dismutase were increased, while the activity of catalase, glutathione reductase and the content of reduced glutathione were decreased compared to the control group. Addition of chromium citrate in a quantity of 10 mcg Cr<sup>3+</sup>/kg body weight to the diet of rats led to the increased activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and the content of reduced glutathione in pancreas, while the addition of this compound in a quantity of 25 mcg Cr<sup>3+</sup>/kg body led to the decreased content of the MDA, activity of superoxide dismutase, but increased activity of catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and the content of reduced glutathione compared to their levels in animals from group II with an experimental diabetes.

*Keywords:* rats, diabetes mellitus, pancreas, antioxidant system.

### ДЕЙСТВИЕ ХРОМ ЦИТРАТА НА ПРО / АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

**Р. Искра, О. Сливинская**

*Институт биологии животных НААН Украины  
ул. В.Стуса, 38, Львов 79034, Украина  
e-mail: iskra\_r@ukr.net*

Исследовали влияние хром цитрата (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CrO<sub>7</sub>) в количествах 10 и 25 мкг Cr/кг массы тела на содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной системы в поджелудочной железе крыс при стрептозотин-индуцированном диабете. Установлено, что в условиях экспериментального диабета в поджелудочной железе крыс II опытной группы обнаружено повышение содержания ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов, повышение активности супероксиддисмутазы, однако снижение активностей каталазы, глутатионредуктазы и содержания восстановленного глутатиона по сравнению с животными контрольной группы. Добавление в рацион крыс хром цитрата в дозе 10 мкг Cr/кг массы тела приводило к увеличению активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и содержания восстановленного глутатиона в поджелудочные железы, тогда как при добавлении этой соли в дозе 25 мкг Cr/кг массы тела – приводило к снижению содержания ТБК-активных продуктов, активности супероксиддисмутазы и к росту активности каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, увеличению содержания восстановленного глутатиона в сравнении с уровнем аналогичных показателей у животных II опытной группы с экспериментальным диабетом.

*Ключевые слова:* крысы, диабет, поджелудочная железа, антиоксидантная система.