

ВПЛИВ ЦИТРАТУ ВАНАДІЮ НА ГЛУТАТІОНОВУ СИСТЕМУ КРОВІ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

Р. Іскра, О. Сушко, Г. Климець, Л. Понкало, С. Гураль

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

Досліджували вплив цитрату ванадію на показники глутатіонової системи в еритроцитах щурів із алоксаніндукованим діабетом. Експерименти були проведені на лабораторних нелінійних щурах, розділених на чотири групи: I група – контрольна, II, III і IV – дослідні. Тваринам II, III і IV груп на тлі 24-годинного голодування індукували експериментальний цукровий діабет у результаті внутрішньоочеревинного введення алоксану в кількості 150 мг/кг маси тіла. Встановлено, що за експериментально викликаного діабету в еритроцитах тварин знижується активність глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та вміст відновленого глутатіону, однак зростає активність глутатіонпероксидази. За впливу цитрату ванадію в еритроцитах щурів із діабетом підвищується активність глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і вміст відновленого глутатіону та знижується активність глутатіонпероксидази, що свідчить про нормалізацію показників глутатіонової ланки антиоксидантного захисту за дії органічної сполуки ванадію.

Ключові слова: діабет, цитрат ванадію, глутатіонова система, алоксан, щурі.

Цукровий діабет є метаболічним захворюванням, що характеризується гіперглікемією, інсулінорезистентністю чи зниженою секрецією інсуліну. Експериментальними і клінічними дослідженнями доведено, що в патогенезі цукрового діабету важлива роль відведена окиснювальному стресу [9]. Утворення вільних радикалів за діабету відбувається пропорційно гіперглікемії, неензиматичному глікозилюванню білків і подальшій їхній окисній деструкції. Аномально високі рівні вільних радикалів і одночасне зниження антиоксидантних захисних механізмів може призвести до пошкодження клітинних органел, збільшення пероксидного окиснення ліпідів і до розвитку резистентності до інсуліну. Наслідки окисного стресу можуть сприяти розвитку ускладнень цукрового діабету [9]. Окиснювальний вплив діабету на клітини крові проявляється відхиленнями деяких їхніх біохімічних параметрів [8, 10].

У дослідженнях на тваринах за експериментально викликаного цукрового діабету першого чи другого типів було встановлено, що антидіабетичні властивості мають сполуки ванадію [7, 11], однак механізми дії цього елемента недостатньо добре вивчені. Є повідомлення про зниження рівня глюкози у крові за впливу ванадієвих солей, тому вони запропоновані як регулятори глікемічного контролю [6, 7].

Відомо, що ванадій погано всмоктується у шлунково-кишковому тракті й швидко виводиться з організму нирками [5], що зменшує його токсичний вплив і накопичення у тканинах, але водночас обмежує його терапевтичну дію. Раніше у дослідженнях на тваринах використовували неорганічні сполуки ванадію, такі як ортованадат натрію і сульфат ванадію. Метою наших досліджень було з'ясувати дію різних кількостей органічної сполуки цитрату ванадію на глутатіонову ланку антиоксидантної системи щурів із алоксаніндукованим діабетом.

Матеріали та методи

Дослідження проведені на 40 білих лабораторних щурах, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 100 до 120 г, та були розділені на

п'ять груп: I група – контрольна, II, III, IV і V – дослідні. Дослідним щурам II групи давали пити чисту воду без добавок, а тваринам III, IV і V груп протягом місяця до питної води додавали розчин цитрату ванадію в кількостях 0,125, 0,5 і 2,0 мкг V/мл води. У тварин усіх чотирьох дослідних груп на тлі 24-годинного голодування був викликаний експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) шляхом внутрішньоочеревиного введення 5 % розчину моногідрат алоксану («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 40-ву добу досліджень тварин виводили з експерименту шляхом забиття за легкого ефірного наркозу. Експерименти на тваринах проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Матеріалом для дослідження були еритроцити крові щурів. Активність глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону; глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) – за швидкістю відновлення глутатіону за наявності НАДФН; глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ДГ, КФ 1.1.1.49) – спектрофотометричним методом, що базується на використанні спряжених систем окиснення нікотинамідних коензимів; вміст відновленого глутатіону (ВГ) – за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс, 2-нітробензойною кислотою [1]. 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 результаті проведених досліджень було встановлено, що високий рівень глюкози у тварин II групи (9 ммоль / л) зумовлює інгібування на 42 % активності Г-6-ФДГ і, відповідно, призводить до зниження внутрішньоклітинних рівнів НАДФН та зростання окиснювального стресу у щурів за ЕЦД. За умови додавання до раціону щурів цитрату ванадію виявлено зростання активності Г-6-ФДГ на 73 % у III і на 43 % у IV групах стосовно активності ензиму у тварин II групи.

У дослідженнях виявлене поступове зниження вмісту ВГ в еритроцитах тварин II і III груп стосовно контрольної, що, очевидно, свідчить про його інтенсивне споживання у реакціях детоксикації активних форм Оксигену за ЕЦД. Крім цього, підвищена секреція ФНО- α , яка виникає за діабету, може зумовлювати пригнічення синтезу відновленого глутатіону [2]. Варто зазначити, що ВГ є основним антиоксидантом еритроцитів; він відіграє роль кофактору при відновленні метгемоглобіну у функціонально активний гемоглобін. Крім того, за його участю здійснюється детоксикація цілої низки токсичних сполук, ксенобіотиків, а також H_2O_2 і гідропероксидів ліпідів, які утворюються в реакціях взаємодії активних форм Оксигену з ненасиченими жирними кислотами мембран еритроцитів [3, 4]. Таким чином, ВГ відіграє важливу роль у збереженні функціональних характеристик мембран еритроцитів.

Глутатіонредуктаза є ензимом, залежним від НАДФН, активність якого пригнічується у разі накопичення окисненої форми нуклеотида [4]. Тому причиною зменшення глутатіонредуктазної активності в еритроцитах тварин II групи на 68 % може бути зниження вмісту НАДФН, утвореного в Г-6-ФДГ-ній реакції. Причиною інактивації ензимів за ЕЦД може бути глікозилювання їхніх молекул. Нормальне функціонування у клітині НАДФН-залежної ГР є дуже важливим для запобігання окисному ушкодженню мембран, які не здатні синтезувати ВГ *de novo*, й тому залежить від інтенсивності відновлення глутатіонредуктазою окисненого глутатіону та його надходження з цитозолу. Зростання активності ГР в еритроцитах тварин III (на 157 %), IV (186 %) і V (на 73 %) груп, порівняно з II групою, свідчить про нормалізацію активності ензиму за дії цитрату ванадію у досліджуваних кількостях.

Показники глутатіонової системи у крові щурів із експериментально індукованим діабетом за впливу цитрату ванадію (M±m, n=8)

Група тварин	Відновлений глутатіон, ммоль/мл	Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв • мг протеїну	Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв • мг протеїну	Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, нмоль/хв • мг протеїну
I – Контроль	0,358±0,031	65,947±3,181	4,359±0,478	1,845±0,208
II – Дослід з ЕЦД	0,331±0,041	86,127±7,068**	1,375±0,287***	1,072±0,133**
III – Д + 0,125 мкг V/мл	0,324±0,018	83,682±4,928**	3,529±0,463###	1,854±0,189##
IV – Д + 0,5 мкг V/мл	0,384±0,036	59,473±6,374##	3,937±0,495###	1,529±0,091##
V – Д + 2,0 мкг V/мл	0,446±0,034#	58,590±1,089*###	2,384±0,234**##	1,297±0,219

Не менш важливим ензимом глутатіонової системи є глутатіонпероксидаза, яка каталізує відновлення H_2O_2 або органічних гідропероксидів і внаслідок цього захищає клітини від дії реактивних форм Оксигену [9]. Результати проведених досліджень показали, що активність ГП в еритроцитах тварин II і III груп зростала порівняно з контролем на 31 і 27 % відповідно, що можна пояснити вичерпанням доступного пулу відновленого глутатіону за ЕЦД. Таке припущення підтверджується даними, згідно з якими активність ГР – ензиму, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу відновленого глутатіону, є зниженою у II групі. За впливу цитрату ванадію активність ГП знижувалася в еритроцитах тварин IV і V груп, відповідно на 31 і 32 %, стосовно тварин II групи.

Загалом отримані результати проведених досліджень свідчать про нормалізацію показників глутатіонової ланки антиоксидантного захисту за впливу цитрату ванадію в еритроцитах щурів із діабетом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Влізла В.В., Федорук Р. С., Ратич І. Б.* та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / за ред. В.В. Влізла. Львів : Сполом, 2012. 764 с.
2. *Лановець І.І., Тимченко А.С., Цугорка Т.М.* Глутатіон і оксидативний стрес // Гематологія і переливання крові. 2012. Вип. 36. Т. 1. С. 168–177.
3. *Федєєнко Г.Д., Просолєнко К.О.* Атрофічний гастрит: механізми виникнення, окремі питання діагностики та оборотності розвитку // Сучасна гастроентерологія. 2007. Т. 43. № 2. С. 7–13.
4. *Хаврона О.П.* Порушення функціонування глутатіонової ланки антиоксидантного захисту в слизовій оболонці шлунка, печінці та еритроцитах щурів при експериментальній виразковій хворобі // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2015. № 1. С. 26–31.
5. *Barceloux D.G.* Vanadium // J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1999. Vol. 37. № 2. P. 265–278.
6. *Bolkent S., Bolkent S., Yanardag R., Tunali S.* Protective effect of vanadyl sulfate on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats // Diabetes Res. Clin. Pract. 2005. Vol.70. №2. P. 103–109.
7. *Goldwaser I., Gefel D., Gershonov E.* et al. Insulinlike effects of vanadium: basic and clinical implications // J. Inorg. Biochem. 2000. Vol. 80. №1-2. P.21–25.
8. *Jin Q., Shen H., Wang H.* et al. Curcumin improves expression of SCF/c-kit through attenuating oxidative stress and NF-kB activation in gastric tissues of diabetic gastroparesis rats // Diabetol. Metab. Syndr. 2013. Vol.5.№1. P.12.
9. *Maritim A., Sanders R., Watkins J.* Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2003. Vol. 17. №1. P. 24–38.
10. *Pimple B., Kadam P., Patil M.* Protective effect of Luffa acutan-gula extracts on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins and antioxidants // Asian Pac. J. Trop. Med. 2012. Vol. 5. №8. P. 610–615.
11. *Ramachandran B., Kandaswamy M., Narayanan V., Subramanian S.* Insulin mimetic effects of macrocyclic binuclear oxovanadium complexes on streptozotocin-induced experimental diabetes in rats // Diabetes Obes Metab. 2003. Vol. 5. № 6. P. 455–461.

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА ВАНАДИЯ НА ГЛУТАТИОНОВУЮ СИСТЕМУ КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ

Р. Искра, О. Сушко, Г. Климец, Л. Понкало, С. Гураль

Институт биологии животных НААН Украины

ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина

e-mail: iskra_r@ukr.net

Исследовали влияние цитрата ванадия на показатели глутатионовой системы в эритроцитах крыс с аллоксаниндуцированным диабетом. Эксперименты были проведены на лабораторных нелинейных крысах, которых разделили на четыре группы: I группа – контрольная, II, III и IV - исследовательские. Животным II, III и IV групп на фоне 24-часового голодания индуцировали экспериментальный сахарный диабет в результате внутривентриального введения аллоксана в количестве 150 мг/кг массы тела. Установлено, что при экспериментально индуцированном диабете в эритроцитах животных снижается активность глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и содержание восстановленного глутатиона, однако возрастает активность глутатионпероксидазы. При влиянии цитрата ванадия в эритроцитах крыс с диабетом повышается активность глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и содержание восстановленного глутатиона, а снижается активность глутатионпероксидазы, что свидетельствует о нормализации показателей глутатионного звена антиоксидантной защиты при действии органического соединения ванадия.

Ключевые слова: диабет, цитрат ванадия, глутатионовая система, аллоксан, крысы.

IMPACT OF VANADIUM CITRATE ON GLUTATHIONE BLOOD SYSTEM IN RATS WITH EXPERIMENTALLY INDUCED DIABETES

R. Iskra, O. Sushko, H. Klymets, L. Ponkalo, S. Gural

Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine

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

e-mail: iskra_r@ukr.net

We investigated the effect of vanadium citrate on the indexes of glutathione system in the blood cells of rats with alloxan-induced diabetes. The experiments were conducted on nonlinear laboratory rats who were divided into four groups: I - control, II, III and IV - research. Animals of II, III and IV groups on the background of 24-hour fast were induced with experimental diabetes as a result of intraperitoneal alloxan injection in an amount of 150 mg/kg on body weight. It has been determined that experimentally induced diabetes leads to reduced activity levels of glutathione and glucose-6-phosphate dehydrogenase, as well as to reduction in glutathione content. Nevertheless, experimentally induced diabetes also leads to increase in the activity of glutathione peroxidase. Vanadium citrate causes an increase in the activity of glutathione reductases and glucose-6-phosphate dehydrogenase and in the restored glutathione, as well as a reduction in the activity of glutathione peroxidase. These facts indicate that the normalization of indexes of antioxidant activity of glutathione link that takes place under the influence of organic vanadium compound.

Keywords: diabetes, vanadium citrate, glutathione system, alloxan, rats.