



УДК 546.46:591.133.2

ДІЯ ЦИТРАТУ МАГНІЮ НА ПРО/АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ПЕЧІНКИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ

О. А. Шатинська, Р. Я. Іскра

*Інститут біології тварин НААН України, вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: shatynska.o@meta.ua*

Досліджували супероксиддисмутазу, каталазу, глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу активності, вміст відновленого глутатіону та продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тканині печінки щурів з алоксан-індукованим цукровим діабетом за умови додавання до їхнього раціону цитрату магнію у дозах 100, 250 і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла. Встановлено, що у печінці щурів з експериментальним діабетом підвищувався вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, вміст відновленого глутатіону й активність каталази та знижувалась активність глутатіонпероксидази. З'ясовано, що введення до складу раціону тварин з експериментальним діабетом цитрату магнію стабілізувало про/антиоксидантний статус печінки щурів. Це проявлялося у підвищенні активності глутатіонпероксидази за одночасного зниження активності каталази, вмісту відновленого глутатіону та продуктів пероксидного окиснення ліпідів із наближенням цих показників до норми.

Ключові слова: магній, цукровий діабет, оксидативний стрес, система антиоксидантного захисту.

ВСТУП

Магній (Mg^{2+}) є одним із найбільш поширених внутрішньоклітинних іонів, що бере участь у багатьох біологічних реакціях, дефіцит якого провокує біохімічні та симптоматичні зміни в організмі [16]. Він як кофактор відіграє важливу роль у більш ніж 300 ензиматичних реакціях, включаючи енергетичний метаболізм і синтез нуклеїнових кислот. Магній може підтримувати структуру та функції біомембран [5]. Він бере участь у регуляції передачі інсулінового сигналу всередину клітини, зокрема у фосфорилуванні тирозинкінази інсулінових рецепторів та, як наслідок, в інсулін-опосередкованому поглинанні глюкози клітинами. Клінічним наслідком хронічного дефіциту Mg^{2+} є інсулінорезистентність, що призводить до зниження утилізації глюкози клітинами [1, 16].

Стан хронічної гіперглікемії є причиною утворення в організмі надмірних кількостей активних форм Оксигену: йонів, вільних радикалів і пероксидів, зокрема завдяки аутоокисненню глюкози [17]. У разі неспроможності клітин подолати гіперпро-

дукування активних форм Оксигену розвивається оксидативний стрес [14], який порушує механізми регуляції клітинної проліферації, міграції і сигналювання поза-клітинного матриксу. Це, у свою чергу, може призвести до змін у цілісності й проникності клітинних мембран і внутрішньоклітинних органел, таких як мітохондрії, що впливає на йонний обмін, процеси окиснення та синтез протеїнів [9].

Посилення оксидативного стресу є основною ланкою у розвитку і прогресуванні цукрового діабету та його ускладнень. Діабет зазвичай супроводжується збільшенням кількості вільних радикалів і порушеннями антиоксидантного захисту. Аномально високі рівні вільних радикалів і одночасне послаблення антиоксидантних захисних механізмів може призвести до пошкодження клітинних протеїнів і ензимів, нуклеїнових кислот, посилення пероксидного окиснення ліпідів, а також спровокувати розвиток резистентності до інсуліну [11].

Печінка бере участь у регуляції рівня глюкози, зокрема, завдяки процесам глікогенезу і ліпогенезу, запасаючи її у глікоген і тригліцероли. У результаті патологічних змін, які відбуваються за цукрового діабету, спостерігається знижене споживання тканинами глюкози з кровоплину, локальне збіднення тканин на внутрішні запаси глюкози у вигляді глікогену і тригліцеролів [4]. Посилення окиснення вільних жирних кислот у печінці може генерувати активні форми Оксигену (АФО), що призводить до структурних і функціональних змін у її клітинах [9]. Тому метою досліджень було вивчити про/антиоксидантний статус печінки щурів з експериментальним діабетом і його корекцію різними кількостями цитрату магнію.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводились у віварії на 25 білих щурах-самках лінії Вістар, які були розділені на п'ять груп: I – контрольна, II, III, IV, V – дослідні. У тварин усіх дослідних груп на тлі 24-годинного голодування був викликаний експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) способом внутрішньоочеревинного введення 5% розчину моногідрат алоксану ("Синбіас") у дозі 150 мг/кг маси тіла. Гіперглікемію виявляли вимірюванням глюкози у крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра ("Gamma-M"). Тварини II групи були з ЕЦД і споживали виключно основний раціон. Щурам III–V дослідних груп до основного раціону протягом 3-х тижнів від початку досліджень, щоб запобігти виникненню ЕЦД, разом із питною водою додавали розчин цитрату магнію у дозах 100 мг/кг маси тіла – III група, 250 мг/кг маси тіла – IV група і 500 мг/кг маси тіла – V група.

Утримання тварин і експерименти проводилися 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). Дослідження також було схвалене Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН України (Протокол № 54 від 11.05.2016 р.).

На 30-ту добу тварин виводили з експерименту під легким ефірним наркозом. Матеріалом для досліджень були 10% гомогенати печінки щурів, які готували на 0,05 М *трис*-HCl буфері, pH 7,8 (1 г тканини та 10 мл буферу). Визначали концентрацію протеїну в гомогенатах тканини печінки за методом Лоурі [18]. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за методом, який ґрунтується

на відновленні нітротетразолію супероксидним радикалом [3], каталазу (КТ, КФ 1.11.1.6) – за зменшенням інтенсивності забарвлення утвореного комплексу H_2O_2 зі солями молібдену [18]. Визначення активності глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) проводили за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК), а активність глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) визначали за швидкістю відновлення глутатіону за наявності NADPH. У гомогенатах печінки вміст відновленого глутатіону (ВГ) визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніона в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з ДТНБК [18], вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) визначали осадженням білків 50% розчином трихлороцтової кислоти й екстракцією ліпідів етанолом з подальшою взаємодією досліджуваних екстрактів з тіоціанатом амонію [13] і визначали вміст ТБК-позитивних продуктів [7].

Експериментальні дані обробляли за допомогою пакету програм Excel. Для оцінки значущості відмінностей при нормальному розподілі кількісних ознак використовували критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Активні форми Оксигену здатні індукувати процеси пероксидного окиснення ліпідів, які призводять до пошкодження біологічних мембран, а відповідно і до серйозних метаболічних порушень функціонального стану різних органів, зокрема печінки. Важливу роль у розвитку оксидативного стресу посідає забезпечення рівноваги про/антиоксидантного статусу, зсув цієї рівноваги в бік прооксидантів викликає компенсаторну активацію антиоксидантної системи [12].

У результаті проведених нами досліджень було встановлено, що у тканині печінки тварин з ЕЦД підвищується вміст ГПЛ і ТБК-позитивних продуктів, що асоційовано зі зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту. Зокрема, за ЕЦД у печінці щурів II групи було виявлено підвищення вмісту ГПЛ на 33,3 % і ТБК-позитивних продуктів на 41,8 % порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 1). У тварин III дослідної групи, порівняно з II групою, достовірно знижується вміст ТБК-позитивних продуктів на 28,3 % і вміст ГПЛ на 12,5 %, що свідчить про зниження інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у печінці за впливу цитрату магнію у дозі 100 мг/кг маси тіла. Разом з тим, у тварин IV дослідної групи спостерігали тенденцію до зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, тоді як вміст ГПЛ суттєво не змінювався. Проте у тварин V дослідної групи ми не спостерігали позитивної динаміки нормалізації досліджуваних показників, що може бути зумовлено занадто високою дозою цитрату магнію (табл.1).

У печінці тварин II групи спостерігали зниження активності СОД, одного з основних ензимів антиоксидантної системи (АОС), порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 2), що може бути зумовлене виснаженням пулу ензиму через його посилене використання у реакції дисмутації. За впливу цитрату магнію на тлі ЕЦД у тварин III і IV дослідних груп спостерігали підвищення активності цього ензиму порівняно з тваринами II дослідної групи. А у тварин V дослідної групи активність СОД достовірно підвищувалась на 18,6 % стосовно тварин II групи, що свідчить про зростання адаптивно-захисної здатності печінки до елімінації АФО за впливу цитрату магнію у дозі 500 мг/кг.

У результаті досліджень встановлено, що активність каталази у тварин II групи з ЕЦД підвищилася, порівняно з інтактними тваринами. Підвищення активності каталази може бути спричинено компенсаторною активацією ензиму за гіперглікемії. За умов додавання до раціону тварин цитрату магнію ми спостерігали достовірне зниження активності каталази у тварин III–V дослідних груп, відповідно на 2,9 % (у III і IV групах) і 5,9 % (у V групі), порівняно з II групою (табл. 2).

Таблиця 1. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тканині печінки щурів ($M \pm m$, $n = 5$)

Table 1. Content of the products of lipid peroxidation in liver tissue of rats ($M \pm m$, $n = 5$)

№ групи	Гідропероксиди ліпідів, ΔD_{480} /г тканини	ТБК-позитивні продукти, нмоль/г тканини
I група	0,06 \pm 0,005	1,77 \pm 0,08
II група	0,08 \pm 0,005*	2,51 \pm 0,12***
III група	0,07 \pm 0,003	1,8 \pm 0,23#
IV група	0,084 \pm 0,006	2,4 \pm 0,38
V група	0,15 \pm 0,02	2,77 \pm 0,29

Примітки: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ вірогідність різниць показників порівняно з I групою; # $P < 0,05$ вірогідність різниць показників порівняно з II групою

Comments: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ significant difference from the I group values; # $P < 0,05$ significant difference from the II group values

Таблиця 2. Активність супероксиддисмутази і каталази в тканині печінки щурів ($M \pm m$, $n = 5$)

Table 2. Activity of the superoxide dismutase and catalase in liver tissue of rats ($M \pm m$, $n = 5$)

№ групи	СОД, ум. од./мг протеїну	Каталаза, ммоль/хв \times мг протеїну
I група	54,7 \pm 1,54	0,32 \pm 0,002
II група	53,21 \pm 1,56	0,34 \pm 0,002***
III група	55,8 \pm 1,37	0,33 \pm 0,003##
IV група	54,01 \pm 1,76	0,33 \pm 0,002#
V група	63,12 \pm 2,23##	0,32 \pm 0,005##

Примітки: *** $P < 0,001$ вірогідність різниць показників порівняно з I групою; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ вірогідність різниць показників порівняно з II групою

Comment: *** $P < 0,001$ significant difference from the I group values; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ significant difference from the II group values

Алоксан, який використовували для моделювання ЕЦД, може генерувати утворення активних форм Оксигену [8]. В результаті відновлення алоксану утворюється діалурова кислота, яка зворотно перетворюється на алоксан з утворенням АФО і супероксидних радикалів [15]. Оптимальний захист від цитотоксичної дії алоксану і діалурової кислоти забезпечується тільки поєднанням функціонування

СОД і каталази, яке повністю запобігає окисно-відновному перетворенню між алоксаном і діалурою кислотою і, таким чином, генерації всіх видів АФО [8].

Активність глутатіонпероксидази у печінці щурів II групи з ЕЦД знижується на 21,5 % порівняно з тваринами I групи. Це може бути зумовлене зменшенням як інтенсивності синтезу, так і підвищенням рівня деградації молекул ензиму за оксидативного стресу, викликаного ЕЦД. Крім цього, за гіперглікемії активуються ензими поліольного шляху окиснення глюкози, а також активується окиснення NADPH, який бере участь у перетворенні глюкози в сорбітол. Активація поліольного шляху перетворення глюкози за гіперглікемії може також побічно знижувати утворення антиоксидантного ензиму ГП [9]. Як відомо, під впливом цього ензиму відновлений глутатіон, за участю NADPH, взаємодіє з вільними радикалами й інактивує їх [12]. Оскільки такий процес залежить від нормального рівня відновленого NADPH, а його недостатність суттєво ослаблює систему антиоксидантного захисту, це може пояснити низький рівень активності ГП у тканині печінки діабетичних тварин [9].

У свою чергу, цитрат магнію зумовлює підвищення активності ГП у тварин III–V дослідних груп на тлі ЕЦД, відповідно на 12,3, 13,7 і 19,2 %, що свідчить про нормалізацію про/антиоксидантного статусу печінки щурів за дії сполуки магнію (табл. 3).

Таблиця 3. Активність глутатіонових ензимів і вміст відновленого глутатіону в тканині печінки щурів ($M \pm m$, $n = 5$)

Table 3. Activity of the enzymes of glutathione system and content of reduced glutathione in liver tissue of rats ($M \pm m$, $n = 5$)

№ групи	Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв×мг протеїну	Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв×мг протеїну	Відновлений глутатіон, ммоль/кг тканини
I група	0,93±0,011	0,039±0,001	0,65±0,003
II група	0,73±0,017***	0,038±0,002	0,87±0,008***
III група	0,82±0,019##	0,02±0,002	0,86±0,004
IV група	0,83±0,073	0,045±0,001##	0,79±0,006###
V група	0,87±0,011####	0,05±0,002##	0,71±0,002###

Примітки: *** $P < 0,001$ вірогідність різниць показників порівняно з I групою; ## $P < 0,01$; #### $P < 0,001$ вірогідність різниць показників порівняно з II групою

Comment: *** $P < 0,001$ significant difference from the I group values; ## $P < 0,01$; #### $P < 0,001$ significant difference from the II group values

Активність ГП у тварин II групи достовірно не змінювалася стосовно контрольної групи тварин, однак спостерігали підвищення цього показника у тварин IV і V дослідних груп, відповідно, на 18,4 і 25 % стосовно II групи (табл. 3).

Вміст ВГ у печінці тварин II групи з ЕЦД достовірно підвищувався на 33,8 % порівняно з тваринами контрольної групи, що може бути зумовлене зниженням активності ГП та його накопиченням у клітинах печінки. У тварин IV і V дослідних груп вміст відновленого глутатіону, порівняно з тваринами II групи, вірогідно знижується на 9,2 і 18,4 %, відповідно (табл. 3).

Як відомо, цукровий діабет часто асоціюється з позаклітинним і внутрішньоклітинним дефіцитом магнію [2]. Це, у свою чергу, робить клітини більш чутливими до окисного стресу [1]. Крім того, дефіцит магнію призводить до дефектів у тирозинкіназній активності інсулінового рецептора та до порушень дії інсуліну [2]. Припускають, що гормони, зокрема інсулін, можуть змінювати активність ензиматичних антиоксидантів у клітинах, а недостатність інсуліну може бути причиною змін антиоксидантного статусу організму [10]. Тому зміни в активності антиоксидантних ензимів у печінці щурів за дії цитрату магнію у дозах 100, 250 і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла, очевидно, зумовлені опосередкованою дією через гормон інсулін на досліджувані ензими.

ВИСНОВКИ

У тканині печінки щурів з експериментальним цукровим діабетом зростає вміст продуктів ПОЛ, вміст відновленого глутатіону й активність каталази. За умов додавання до раціону щурів з експериментальним цукровим діабетом цитрату магнію в дозі 100, 250 і 500 мг Mg^{2+} /кг маси тіла знижується вміст відновленого глутатіону, продуктів ПОЛ (у дозі 100 мг Mg^{2+} /кг маси тіла), підвищуються активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази, тобто нормалізується про/антиоксидантний статус печінки щурів з ЕЦД.

1. *Barbagallo M., Dominguez L.J., Galisto A. et al.* Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. **Mol. Aspects Med**, 2003; 24: 39–52.
2. *Barbagallo M., Dominguez L.J.* Magnesium and type 2 diabetes. **World J. Diabetes**, 2015; 6(10): 1152–1157.
3. *Chevari S., Andyal T., Shtirenger D.* Determination of the antioxidant properties of blood and their diagnostic value in old age. **Lab. Delo**, 1991; 10:9–13. (In Russian).
4. *Drel V.R.* Main mechanisms of the initiation and development of diabetic complications: the role of nitrative stress. **Studia Biologica**, 2010; 4(2): 141–158. (In Ukrainian).
5. *Fawcett W.J., Haxby E.J., Male D.A.* Magnesium: physiology and pharmacology. **British Journal of Anesthesia**, 1999; 83(2): 302–320.
6. *Hnativ V.V., Demchak Kh.S., Babulenko O.M.* Reactive oxygen species in the pathogenesis of angiopathy at diabetes mellitus of type 2. **Medical and Clinical Chemistry**, 2013; 15(1): 145–149. (In Ukrainian).
7. *Korobeynikova E.N.* A modification of lipid peroxidation products assessment in the reaction with thiobarbituric acid. **Lab. Delo**, 1989; 7: 8. (In Russian).
8. *Lenzen S.* The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, 2008; 51: 216–226.
9. *Lucchesi A.N., de Freitas N.T., Cassettari L.L. et al.* Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2013; 28(7): 502–508.
10. *Lupak M.I., Khokhla M.R., Hachkova G.Ya. et al.* The alkaloid-free fraction from Galega officinalis extract prevents oxidative stress under experimental diabetes mellitus. **The Ukrainian Biochemical Journal**, 2015; 87(4): 78–86.
11. *Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins III J.B.* Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review **J. Biochem. Molecular. Toxicology**, 2003; 17(1): 24–38.
12. *Melekh B.Ya., Regeda M.S., Kachmarska M.O.* Glutathione antioxidant systems and processes of lipid peroxidation in guinea pigs blood with experimental allergic alveolitis in different periods of its formation. **BMH Journal**, 2013; 17, 4(68): 98–100. (In Ukrainian).

13. Mironchik V.V. **Method of determination of lipid hydroperoxides in biological tissues.** Patent SU, no. 1084681. 1984. (In Russian).
14. Morhan D.S., Chong Q., Maiese K.C. **Oxidative Stress and Diabetes.** Department of Newology, 8e-I UHC, Wayne State University School of Medicine. 2006; 4201.
15. Rohilla A., Ali S. **Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects.** Int. J. Res. Pharma Biomedical Sci, 2012; 3:819-823.
16. Sales C.R., de Fatima Campos Pedrosa L. Magnesium and diabetes mellitus: Their relation. **Clinical Nutrition**, 2006; 25(4): 554–562.
17. Tiwari B.K., Pandey K.B., Abidi A.B., Rizvi S.I. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **Journal of Biomarkers**, 12/2013; 2013(1):1–8.
18. Vlizlo V.V., Fedoruk R.S., Ratych I.B. et al. (red. Vlizlo V.V.). **Laboratory methods of research in biology, veterinary medicine: a guide.** Lviv: SPOLOM, 2012. 764 p. (In Ukrainian).

THE EFFECT OF MAGNESIUM CITRATES ON PRO-OXIDATIVE/ANTIOXIDATIVE STATUS IN RAT LIVER AT EXPERIMENTAL DIABETES

O. Shatynska, R. Iskra

*Institute of Animal Biology, UAAS of Ukraine, 38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: shatynska.o@meta.ua*

The activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, the content of reduced glutathione and products of lipid peroxidation in liver tissue of rats with alloxan-induced diabetes were investigated. Magnesium citrate in doses 100, 250, and 500 mg Mg²⁺/kg body weight was added to the animal diet. It was established that the content of the products of lipid peroxidation and the reduced glutathione, the activity of catalase increased, while the activity of glutathione peroxidase decreased in the liver of rats with experimental diabetes. It was found that the magnesium citrate addition to the diet of animals with experimental diabetes allows to stabilize prooxidative/antioxidative status in rats' liver. The stabilization was accompanied by an increase in activity of the glutathione peroxidase and decrease in catalase activity. The content of reduced glutathione and products of lipid peroxidation approaches to normal level.

Keywords: magnesium, diabetes mellitus, oxidative stress, antioxidant defense system.

ДЕЙСТВИЕ ЦИТРАТА МАГНИЯ НА ПРО/АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

Е. А. Шатинская, Р. Я. Искра

*Институт биологии животных НААН Украины, ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина
e-mail: shatynska.o@meta.ua*

Исследовали супероксиддисмутазную, каталазную, глутатионпероксидазную, глутатионредуктазную активности, содержание восстановленного глутатиона и продуктов перекисного окисления липидов в ткани печени крыс с аллоксан-индуциро-

ванным сахарным диабетом при добавлении в их рацион цитрата магния в дозах 100, 250 и 500 мг Mg^{2+} /кг тела. Установлено, что в печени крыс с экспериментальным диабетом повышалось содержание продуктов перекисного окисления липидов, содержание восстановленного глутатиона, активность каталазы и снижалась активность глутатионпероксидазы. Установлено, что введение в состав рациона животных с экспериментальным диабетом цитрата магния позволяло стабилизировать про/антиоксидантный статус печени крыс. Это сопровождалось повышением активности глутатионпероксидазы, однако снижением активности каталазы, содержания восстановленного глутатиона и продуктов перекисного окисления липидов с приближением этих показателей к норме.

Ключевые слова: магний, сахарный диабет, оксидативный стресс, система антиоксидантной защиты.

Одержано: 08.04.2016