

УДК 546.881:577.122

Климець Г. В., Іскра Р. Я.

ВПЛИВ ЦИТРАТУ ВАНАДІЮ НА БІЛКОВИЙ ОБМІН У КРОВІ ЩУРІВ З АЛОКСАН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

klimets.halyna@gmail.com

Досліджували вплив цитрату ванадію на вміст загального білка та його фракцій, сечовини та креатиніну, а також активність аспартат- і аланінаміно-трансферази та лужної фосфатази в плазмі крові щурів з експериментальним діабетом. Тварини були розділені на п'ять груп: I група – контрольна, II, III, IV і V – дослідні. У тварин усіх чотирьох дослідних груп індукували експериментальний цукровий діабет. Щурам I та II-ї груп 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 результаті проведених досліджень встановлено зростання рівня сечовини, активності лужної фосфатази та аспартатамінотрансферази у плазмі крові тварин II групи відносно контрольної. Вміст загального білка та α -глобулінів у II групі знижувався, в той час як концентрація β -глобулінів – підвищувалась, відносно I групи. За випоювання тваринам цитрату ванадію спостерігалось вірогідне зниження сечовини, креатиніну, активності амінотрансфераз та лужної фосфатази, порівняно з активністю у тварин II групи. Таким чином, за дії цитрату ванадію відбувається нормалізація білкового метаболізму, порушення якого виникали за експериментального цукрового діабету.

Ключові слова: цитрат ванадію; діабет; біохімічні параметри; загальний білок; фракції білка.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконувалися в рамках завдання 35.00.01.02. Ф. «Вивчити біологічні особливості дії цитратів мікроелементів в різні періоди онтогенезу тварин», № держ. реєстрації 0116U001407.

Вступ. Діабет характеризується надмірним рівнем циркулюючої глюкози внаслідок абсолютної чи відносної недостатності інсуліну. На сьогодні, люди страждають не тільки від діабету, а й від пов'язаних з ним ускладнень [9]. В організмі хворих на цукровий діабет, крім порушення обміну вуглеводів і ліпідів, інтенсифікується білковий обмін, причому процес розпаду білка відбувається швидше, ніж синтезу, що призводить до його втрат [10].

Сполуки ванадію мають здатність активувати інсуліновий сигнальний каскад через фосфорилю-

вання ключових білків цього шляху в клітинах організму [11]. Ванадій розглядається як інсулінопідсилюючий агент, у зв'язку із конкурентним гальмуванням регуляторних фосфатаз, зокрема фосфатази 1В (pp1B) за діабету. Ці фосфатази є першими ензимами в інсулін-регуляторному каскаді і є чутливіми до пригнічення ванадієвмісними сполуками [4].

Метою даної роботи було дослідити особливості білкового обміну в організмі щурів з експериментальним діабетом та визначити профілактичну дію цитрату ванадію на це захворювання.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проводилися згідно «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Дослідження проведені на 40 лабораторних щурах-самцях, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 100 до 120 г. Тварини були розділені на п'ять груп: I група – контрольна, II, III, IV і V – дослідні. Щурам I та II-ї груп 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-ох годинного голодування індукували експериментальний цукровий діабет (ЦД) шляхом внутрішньоочеревинного введення 5% розчину алоксан моногідрату («Синбіас») в кількості 150 мг/кг маси тіла. В результаті вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра («Gamma-M») виявляли гіперглікемію. На 40 добу досліджень тварин виводили з експерименту шляхом забиття. Матеріалом для дослідження була плазма крові щурів, у якій визначали вміст загального білка методом Лоурі та його фракції методом вертикального електрофорезу [15], активності аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), вміст сечовини та креатиніну – на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000 (Німеччина). Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми «Statistika». Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами застосовували критерій Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження обміну білків відіграє важливу роль у порушенні функцій печінки, пов'язаної з цукровим діабетом. У результаті проведених досліджень було встановлено незначне зростання рівня сечовини в плазмі крові тварин II групи на 5,7%, порівняно з I групою (табл. 1). Вміст креатиніну в II групі, порівняно з контролем, вірогідно не змінювався, хоча є повідомлення інших авторів про зв'язок між високим рівнем сечовини, креатиніну та глюкози за розвитку діабету [13].

Активність ЛФ у плазмі крові тварин II групи збільшувалась на 51,5%, відносно I групи. Як свідчать дані літератури, за умов діабету як I, так і II типу активність ЛФ значно підвищується, проте за ЦД II типу активність ензиму є вищою, ніж за ЦД I типу, чим пояснюється печінкова дисфункція за ЦД II [12].

Виявлено зростання на 28% активності АсАТ у крові тварин II групи, порівняно із контролем. Активність АлАТ в крові щурів II групі вірогідно не змінювалася. АлАТ і АсАТ каталізують перенесення аміногруп для генерації продуктів глюконеогенезу та амінокислотного метаболізму. Зростання АсАТ і АлАТ сигналізує про розвиток ЦД. Активності печінкових ензимів γ -глутамілтрансферази, АлАТ та АсАТ корелюють один з одним [16], мають загальні генетичні взаємозалежні зміни за патологічних станів, в тому числі за діабету [12]. Можна припустити, що зв'язок між активністю АсАТ і ризиком розвитку ЦД II може бути опосередкований через вплив інших ензимів печінки [8].

У дослідженнях було встановлено, що за умови випоювання щурам цитрату ванадію спостерігалось зниження активності ЛФ в крові тварин III, IV та V груп на 31,2, 45,1 і 33,6%, АсАТ – на 18,7, 14,0 і 16,6%, АлАТ – на 14,2, 25,6 і 9,9%, а також рівня сечовини – на 6,6, 20,4 та 26,4% та креатиніну – на 13,2, 13,3 та 11,0%, порівняно з II групою (табл. 1). Отримані результати підтверджують дослідження інших авторів щодо зниження активності АлАТ у крові тварин із ЦД за дії органічних сполук Ванадію [7].

Встановлено, що вміст загального білка у крові тварин II групи з діабетом знизився на 30,5% порівняно з контрольною групою (табл. 2). Гіпопротеїнемія може бути викликана захворюваннями печінки, нирок, підшлункової залози, в тому числі за цукрового діабету [5]. За даними інших авторів зменшення кількості загального білка в плазмі крові зумовлене змінами відносних кількостей альбумінів і α -глобулінів [14]. У наших дослідженнях відносний вміст альбумінів у крові тварин II групи з діабетом, порівняно до контролю, вірогідно не змінювався.

Аналіз білкових фракцій дозволяє виявити зміни рівнів експресії деяких білків, які беруть участь в обмінних процесах, за умов запалення і оксидативного стресу, що є неодмінними супутниками діабету [2]. Зміни концентрації сироваткового альбуміну, α - та γ -глобулінів є важливими діагностичними показниками метаболічних захворювань, в тому числі за цукрового діабету [1].

Таблиця 1 – Біохімічні показники плазми крові щурів ($M \pm m$, $n=8$)

Групи	Креатинін, ммоль/л	Сечовина, ммоль/л	Лужна фосфатаза, од/л	АсАТ, од/л	АлАТ, од/л
I	74,2 \pm 0,19	13,2 \pm 0,65	548,7 \pm 38,55	190,8 \pm 3,69	91,6 \pm 8,75
II	74,3 \pm 2,30	14,0 \pm 0,1	831,6 \pm 35,6***	244,0 \pm 18,5**	94,6 \pm 2,50
III	67,2 \pm 1,69***#	13,1 \pm 0,72	571,8 \pm 28,38###	198,2 \pm 19,6	81,1 \pm 6,05
IV	66,6 \pm 3,24*	11,1 \pm 1,35	519,1 \pm 30,65###	185,4 \pm 2,0##	70,3 \pm 2,37***##
V	66,1 \pm 4,85	11,1 \pm 1,15#	552,0 \pm 55,2###	203,4 \pm 12,0	85,2 \pm 13,05

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, вірогідно відносно контролю; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$, вірогідно відносно II групи.

Таблиця 2 – Дія цитрату ванадію на концентрацію загального протеїну та його фракцій у плазмі крові щурів із експериментальним діабетом ($M \pm m$, $n=8$)

Групи	Загальний протеїн	Глобуліни, %			Альбуміни, %
		α -	β -	γ -	
I	0,151 \pm 0,007	17,15 \pm 0,87	30,36 \pm 0,38	14,25 \pm 0,361	38,24 \pm 0,420
II	0,105 \pm 0,017*	14,08 \pm 0,971*	32,97 \pm 0,760**	14,46 \pm 0,422	38,49 \pm 0,920
III	0,111 \pm 0,008**	10,42 \pm 0,910***##	30,75 \pm 0,311##	15,90 \pm 0,710	42,94 \pm 0,50***###
IV	0,134 \pm 0,019	12,58 \pm 0,782***	33,83 \pm 0,821***	13,88 \pm 0,827	37,96 \pm 0,780
V	0,106 \pm 0,025	11,00 \pm 0,760***#	30,43 \pm 2,610	16,75 \pm 0,532***##	41,82 \pm 0,921***##

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, вірогідно відносно контролю; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$, вірогідно відносно II групи.

У дослідженнях встановлено, що в плазмі крові щурів II дослідної групи, вміст α -глобулінів знизився на 3,1%, відносний вміст β -глобулінів підвищився на 2,6%, рівень γ -глобулінів вірогідно не змінювався, стосовно контролю. У дослідженнях інших авторів виявлено значне зменшення кількості сироваткового альбуміну та зростання β -глобуліну в крові осіб з цукровим діабетом, у той час як вірогідних змін γ -глобулінової фракції не встановлено [6].

За умов випоювання щурам цитрату ванадію в плазмі крові щурів III і IV груп зростання рівня загального білка відбулося на 5,71% та 27,62%, порівняно з II групою, в той час як у V групі – вірогідно не змінювався.

Зміни у фракціях альбумінів, α -, β - та γ -глобулінів за дії ванадій цитрату відбулись незначні. Зокрема, у тварин III та V груп відбулося зростання вмісту альбуміну на 11,6% і 8,65%, відносно II групи (табл. 2). Альбумін є важливим засобом для

транспортування сполук ванадію кров'яним руслом і сприяє їх доставці до клітин-мішеней [3].

У плазмі крові тварин III, IV і V груп спостерігалося зниження α -глобулінів на 3,7%, 2,5% та 3,1% порівняно з II групою. Зниження вмісту β -глобулінів відбулося у III – на 2,2% і V – на 2,54% групах, порівняно з II групою.

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать, що цитрат ванадію зумовлює нормалізацію білкового метаболізму, порушення якого виникають за експериментального цукрового діабету. У майбутньому він може використовуватися як препарат для профілактики і лікування діабету та припиняти ускладнення, пов'язані з білковим метаболізмом.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому плануються дослідження впливу сполук Ванадію на білковий обмін у щурів за різних фізіологічних та патологічних станів.

References

- Bessonova EA, Kartsova LA, Shmukov AIU. Electrophoretic determination of albumin in urine using on-line concentration technique. *Journal of Chromatography A*. 2007;332:1150.
- Corton M, Botella-Carretero J, Lopez A, Camafeita E, Millan LS, Escobar Morreale HF, Peral B. Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Human Reproduction*. 2008;23:651–61.
- Dias M David, João PGLM Rodrigues, Neuza S Domingues, Alexandre MJJ Bonvin, Margarida CA Castro. Unveiling the interaction of vanadium compounds with human serum albumin by using 1 H STD NMR and Computational Docking Studies. *Eur J Inorg Chem*. 2013:4619–27.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 1999;283:1544–8.
- Karen Kim E, Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Protein-losing gastroenteropathy. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease*. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002. 810–27.
- Kashino Harayamab T, Pakras HB, Satoh K. Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 2007;849:282–92.
- Krosniak M, Francik R, Kolodziejczyk K, Wojtanowska-Kroaniak A, Tedeschi A, Petrone V, Gryboa R. Investigation of the influence of vanadium compounds treatment in NZO mice model – preliminary study. *Acta poloniae pharmaceutica – drug research*. 2014;71(2):271–8.
- Kunutsor SK, Abbasi A, Apekey TA. Aspartate aminotransferase – risk marker for type-2 diabetes mellitus or red hering. *Front. Endocrinol*. 2014;5:189.
- Maritim A, Sanders R, Watkins J. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24–38.
- Nair KS Garrow JS, Ford C, Mahler RF, Halliday D. Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia*. 1983;25(5):400–3.
- Passadouro M, Metelo AM, Melão AS, Pedro JR, Faneca H, Carvalho E, Castro MMCA. Study of the antidiabetic capacity of the VO(dmp)₂ complex. *J Inorg Biochem*. 2010;104:987–92.
- Rahmioglu N, Andrew T, Cherkas L, Surdulescu G, Swaminathan R, Spector T. Epidemiology and genetic epidemiology of the liver function test proteins. *PloSONe*. 2009;4(2):35–44.
- Shrestha S, Gyawali P, Shrestha R, Poudel B, Sigdel M, Regmi P, Shrestha M, Yadav BK. Serum urea and creatinine in diabetic and non-diabetic subjects. *Journal of Nepal Association for medical laboratory sciences*. 2008;9(1):11–2.
- Venkataramana G, Indira P, Rao DVM. Changes of plasma total proteins, albumin and fibrinogen in type 2 diabetes mellitus – a pilot study. *Indian journal of basic and applied medical research*. 2013;2(7):679–85.
- Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratich IB ta in. Laboratorni metodi doslidzhen' u biologii, tvarinnitstvi ta veterinarniy meditsini: dovidnik. L'viv: Spolom; 2012. 764s.
- Whitfield JB, Zhu G, Nestler JE, Heath AC, Martin NG. Genetic covariation between serum gamma-glutamyl transferase activity and cardiovascular risk factors. *Clin Chem*. 2002;48:1426–31.

УДК 546.881:577.122

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА ВАНАДИЯ НА БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН В КРОВИ КРЫС С АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ

Климец Г. В., Искра Р. Я.

Резюме. Исследовали влияние цитрата ванадия на содержание общего белка и его фракций, мочевины и креатинина, а также активности аспартат- и аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы в плазме крови крыс с экспериментальным диабетом. Животные были разделены на пять групп: I группа – контрольная, II, III, IV и V – опытные. У животных всех четырех опытных групп индуцировали экспериментальный сахарный диабет. Крысам I и II-й группы давали пить чистую воду без добавок, а животным III, IV и V групп в течение месяца к питьевой воде добавляли раствор цитрата ванадия в количествах 0,125, 0,5 и 2,0 мкг V/мл воды. В результате проведенных исследований установлено повышение уровня мочевины, активности щелочной фосфатазы и аспартаминотрансферазы в плазме крови животных II группы относительно контрольной. Содержание общего белка и α -глобулинов во II группе снижалось, в то время как концентрация β -глобулинов – увеличивалась, относительно I группы. После выпаивания животным цитрата ванадия наблюдалось вероятное снижение мочевины, креатинина, активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы, по сравнению с уровнем у животных II группы. Таким образом, при действии цитрата ванадия нормализуется белковый метаболизм, нарушение которого возникает при экспериментальном сахарном диабете.

Ключевые слова: цитрат ванадия; диабет; биохимические параметры; общий белок; фракции белка.

UDC 546.881:577.122

THE EFFECT OF VANADIUM CITRATE ON THE METABOLISM OF PROTEINS IN RATS' BLOOD WITH ALLOXAN-INDUCED DIABETES MELLITUS

Klymets H. V., Iskra R. Ja.

Abstract. The effect of vanadium citrate on the content of total protein and its fractions, urea and creatinine, as well as the activity of ASAT, ALAT and alkaline phosphatase in the blood plasma of experimentally diabetic rats was studied. It is considered that vanadium salts possess insulin-like properties. The study of protein metabolism plays an important role in the violation of liver function associated with diabetes mellitus. Therefore, the aim of the studies was to find out the mechanisms of vanadium action on protein metabolism in the body of experimentally induced diabetic rats. Animals were divided into five groups: group I – control, II, III, IV and V – experimental one. Rats of the 1st and 2nd groups were given to drink clean water without additives, and animals of the 3rd, 4th and 5th groups were given to drink water with the solution of vanadium citrate for a month. Experimental diabetes mellitus by means of intraperitoneal administration of a 5% solution of alloxan monohydrate in the amount of 150 mg / kg body weight was induced in animals of all the four study groups. Hyperglycemia was revealed by the measurement of blood glucose collected from the tail vein.

The total protein was determined by Lowry's method, its fractions – by vertical electrophoresis on polyacrylamide gel plates. Determination of the content of urea, creatinine, aminotransferase and alkaline phosphatase activity was performed on a biochemical analyzer.

It was showed an increase in the level of urea, the activity of alkaline phosphatase, ASAT in the blood plasma of animals of the second in regard to the control group. There is a complex connection between the levels of liver enzymes, because they are genetically correlated with each other.

Changes in the concentration of serum albumin, α -, β - and γ -globulins are supposed to be a diagnostic index of metabolic diseases, including diabetes mellitus. The studies found that the content of total protein and α -globulins decreased in the blood plasma of rats in the second research group, while the relative content of β -globulins increased and γ -globulin did not change significantly in regard to the control.

The level of urea and creatinine in the blood plasma of rats of the 3rd, 4th, 5th groups in regard to the group the 2nd decreased. The activity of alkaline phosphatase, ACAT and ALT in the same groups in regard to the second group also decreased. In the conditions of watering vanadium citrate, in the blood plasma of rats of the 3rd and the 4th groups, the level of total protein increased, in comparison with the 2nd, while its level in the 5th group did not change reliably. Changes in the fractions of albumins, α -, β - and γ -globulins due to the effects of vanadium citrate were insignificant, however, the animals of groups of the 3rd and 5th showed a significant increase in the albumin content in regard to the 2nd group.

The results of the studies demonstrate that vanadium citrate positively influenced the rat blood biochemical parameters under study, contributed to the approach of their level to the parameters of the control group animals. Thus, vanadium citrate can halt the complications associated with protein metabolism, which occur in diabetes mellitus. In the future, studies of the effect of various vanadium compounds on protein metabolism in the body of animals under various physiological and pathological conditions are planned.

Keywords: vanadium citrate; diabetes mellitus; biochemical parameters; total protein; protein fractions.

Стаття надійшла 07.04.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування