

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Слівінська Оксана Миколаївна**

УДК 615.252.349.7:546.47:546.76

**ДИСЕРТАЦІЯ  
ВУГЛЕВОДНИЙ ОБМІН І АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА  
В ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ  
ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ЦИТРАТАМИ ХРОМУ І ЦИНКУ**

**03.00.04 – біохімія (біологічні науки)**

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело \_\_\_\_\_ О.М. Слівінська

Науковий керівник:

Іскра Руслана Ярославівна,  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Львів – 2020

## АНОТАЦІЯ

**Слівінська О. М. Вуглеводний обмін і антиоксидантна система у щурів з експериментальним цукровим діабетом та їх корекція цитратами хрому і цинку.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «біохімія» (біологічні науки). – Інститут біології тварин НААН України, Львів, 2020.

Цукровий діабет (ЦД), крім хронічної гіперглікемії, характеризується порушеннями вуглеводного, ліпідного і протеїнового обмінів, що впливає на здоров'я та тривалість життя людей. В основі складової патогенезу цукрового діабету та його специфічних і неспецифічних ускладнень лежить оксидативний стрес. Зростання вмісту активних форм кисню (АФК) за умов гіперглікемії, а також здатність взаємодіяти з NO, утворюючи цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних і метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету.

Тому, метою досліджень було з'ясувати особливості вуглеводного обміну та стану про/антиоксидантної системи в організмі лабораторних щурів із стептозоточин індукованим діабетом та корегуючого впливу на ці процеси цитратів хрому та цинку, синтезованих методом нанотехнології.

Дослідження проводилися на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою 150-170 г, що утримувалися в умовах віварію Інституту біології тварин НААН України, за відповідного температурного режиму (20-25°C), вологості (40-45 %) та освітлення з дотриманням етичних норм проведення експериментів на щурах згідно з “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями “Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовують в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург,

Франція, 1985) та протоколом комісії з біоетики Інституту біології тварин (№ 75 від 23.10.2018).

Було проведено три серії досліджень. У першій і другій серії досліджували вплив різних доз цитрату хрому і цитрату цинку, а в третій серії – сумісну дію цих сполук в оптимальних дозах на окремі ланки метаболічних процесів в організмі лабораторних тварин із експериментальним діабетом.

У перших двох серіях щури були розділені на чотири групи: I група – контрольна, II, III і IV – дослідні, причому II група – тварини з ЦД<sub>E</sub>, а тварини III і IV дослідних груп у першій серії досліджень протягом чотирьох тижнів із водою споживали цитрат хрому в дозах 10 і 25 мкг Cr<sup>3+</sup>/кг маси тіла, а в другій серії – цитрат цинку в дозах 20 і 50 мг Zn<sup>2+</sup>/кг маси тіла відповідно. У третій серії досліджень, тваринам III групи із водою сумісно додавали до раціону цитрат хрому в дозі 25 мкг Cr<sup>3+</sup>/кг м.т і цитрат цинку в дозі 50 мг Zn<sup>2+</sup>/кг маси тіла.

Для індукції експериментального цукрового діабету (ЦД<sub>E</sub>) тваринам усіх дослідних груп першої, другої і третьої серії досліджень на тлі 24-годинного голодування на 30 добу, з моменту постановки досліду, одноразово внутрішньочеревинно вводили розчин стрептозотоцину (“Sigma”, США), з розрахунку 65 мг/кг, який розводили цитратним буфером (рН 4,5) з попереднім (за 15 хв) інтраперитонеальним уведенням нікотинамідом в дозі 230 мг/кг. Щурам контрольної групи вводили аналогічний об’єм розчинника (цитратний буфер з рН 4,5). Виникнення гіперглікемії спостерігали вже з 3 доби після введення стрептозотоцину. Тривалість досліджень ЦД<sub>E</sub> становила 10 діб, з моменту введення діабетогенної речовини. Для підтвердження гіперглікемії проводилось щодобове вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра (“Gamma-M”). Для експерименту використовували щурів, у яких концентрація глюкози у сироватці крові становила від 14 ммоль/л і вище. Забій тварин для проведення біохімічних досліджень, проводили на 40 день досліджень шляхом декапітації за легкого тіопенталового наркозу.

Вивчення активності ензимів і субстратів вуглеводного обміну, продуктів пероксидного окиснення ліпідів, ензимів антиоксидантної системи проводили в

клітинах крові та тканинах скелетних м'язів, печінки, підшлункової залози, як таких, що беруть участь у процесах нагромадження та утилізації глюкози.

За введення стрептозотоцину, який селективно вражає  $\beta$ -клітини острівців підшлункової залози, виникав експериментальний діабет, що супроводжувався недостатньою секрецією гормону. Це підтверджувалося результатами наших досліджень, у яких спостерігалось вірогідне зниження рівня інсуліну та С-пептиду та зростання концентрації глюкози, глікозильованого та загального гемоглобіну в крові щурів із ЦД<sub>E</sub>.

У  $\beta$ -клітинах підшлункової залози метаболізм глюкози має важливе значення для регуляції секреції інсуліну. Глюкоза захоплюється глюкозними транспортерами та фосфорилується під дією глюкокінази з генеруванням АТФ, який є основним рушієм глюкозо-індукованої секреції інсуліну. Підвищення концентрації глюкози в крові тварин із ЦД<sub>E</sub> може бути пов'язане як з недостатнім синтезом і вивільненням інсуліну  $\beta$ -клітинами острівців Лангенганса, так і з певними змінами на рівні гормонорецепторної взаємодії з клітинами інсуліночутливих тканин. Згадані порушення можуть призводити до певного дисбалансу на внутрішньоклітинному метаболічному рівні тканин-мішеней гормону, зокрема порушення процесів утилізації глюкози, що відповідно і знайшло відображення на активності досліджуваних ензимів вуглеводного обміну.

У результаті проведених експериментів в усіх серіях досліджень було встановлено, що за умов ЦД<sub>E</sub> в крові щурів виявлені зміни показників вуглеводного обміну як у крові, так і тканинах тварин, зокрема підвищення лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах, печінці (однак незначне зниження активності – в першій серії досліджень), скелетних м'язах і підшлунковій залозі та зниження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності в еритроцитах, печінці та скелетних м'язах, однак зростання – в підшлунковій залозі.

В основі складової патогенезу цукрового діабету та його специфічних і неспецифічних ускладнень лежить оксидативний стрес. Джерелами інтенсивного

утворення вільних радикалів за умов ЦД є неензиматичні, ензиматичні та мітохондріальні шляхи. Підвищений рівень продуктів ПОЛ при цукровому діабеті може бути пов'язаний зі зміною функції мембран еритроцитів і клітин інших тканин організму. Це зумовлює пригнічення активності АОС, що призводить до накопичення радикалів супероксиду, які викликають максимальне пероксидне окиснення ліпідів та пошкодження тканин при діабеті.

Встановлено, що за умов цукрового діабету в крові та тканинах тварин зростає вміст продуктів ПОЛ. Крім цього, зазнавала змін і система антиоксидантного захисту в організмі щурів із ЦД<sub>Е</sub>. Зокрема, в еритроцитах зростала СОД-на активність, в той час як КТ-, ГП- і ГР-на активності – знижувалися. У тканинах тварин із ЦД<sub>Е</sub> знижувалася активність ензимів АОС, зокрема, у скелетних м'язах – СОД-, КТ-, ГП-, ГР-на активності; у печінці – КТ- ГП- і ГР-на активності та вміст ВГ; у підшлунковій залозі – КТ-, ГП- і ГР-на активності та вміст ВГ, однак СОД-на активність – зростала.

Основним механізмом оксидативно-нітративного стресу при діабеті є порушення в електрон-транспортному ланцюзі мітохондрій. Зростання вмісту супероксид-аніону за умов гіперглікемії, а також його здатність при взаємодії з NO утворювати цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних та метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету.

Еритроцити шляхом синтезу, транспортування та вивільнення продуктів метаболізму NO і АТФ, тим самим контролюють біодоступність NO для судин. В еритроцитах тварин із ЦД<sub>Е</sub> встановлено вірогідне зростання загальної NOS та індукцибельної NOS активності, у той час як конститутивна NOS активність не змінювалася. Підвищення іNOS активності можна пов'язати зі збільшенням утворенням H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та впливом прозапальних цитокінів, які активують експресію mRNA іNOS.

Розуміння особливостей патогенетичної та терапевтичної значущості рівня макро- та мікроелементів у хворих на цукровий діабет має велике значення для діагностики, профілактики та лікування цієї хвороби. Зокрема, мікроелементи є

найважливішими каталізаторами різних біохімічних процесів, обміну речовин, відіграють значну роль в адаптації організму як у нормі, так і за патології. Хром і Цинк – відносяться до есенціальних мікроелементів, які виконують безліч фізіологічних і біохімічних функцій в організмі.

За експериментального цукрового діабету вміст Хрому і Цинку у тканинах щурів був знижений, однак за умов додавання до раціону щурів цитратів хрому і цинку спостерігалось вірогідне підвищення вмісту як Хрому, так і Цинку у печінці та скелетних м'язах.

Цитрати мікроелементів, синтезовані шляхом нанотехнології, мають високу біологічну активність, вони є нетоксичні, посилюють травлення, збільшують активність багатьох ензимів, вітамінів, тому добре засвоюються організмом і використовуються в обмінних процесах. За сумісної дії цитратів хрому та цинку у крові тварин спостерігалось вірогідне зниження концентрації глюкози, рівня глікозильованого гемоглобіну та загального гемоглобіну, однак підвищення вмісту інсуліну і С-пептиду, у порівнянні із показниками у тварин із ЦД<sub>Е</sub>. Крім цього, за дії цитратів хрому і цинку спостерігалось вірогідне зниження рівня лактату в крові, зменшення лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах і тканинах скелетних м'язів, однак вірогідне підвищення Г-6-ФДГ-ної активності в еритроцитах, тканинах печінки та скелетних м'язів, порівняно з показниками у тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

За умов сумісного додавання до раціону щурів цитратів мікроелементів у плазмі крові та тканинах вірогідно знижувався вміст ГПЛ і ТБК-активних продуктів. Зниження вмісту продуктів ПОЛ свідчить про інгібувальний вплив досліджуваних елементів, при збільшенні споживанні їх тваринами, на процеси пероксидного окиснення ліпідів в крові, печінці, м'язах і підшлунковій залозі, які характеризуються високою метаболічною активністю.

За дії цитратів хрому і цинку виявлено активацію антиоксидантної системи, зокрема, в еритроцитах знижувалася СОД-на активність, однак підвищувався вміст відновленого глутатіону та ГП-на активність; у скелетних м'язах – підвищувалися СОД-, КТ- і ГР-на активності; у печінці та підшлунковій залозі –

знижувалася СОД-на активність, однак підвищувалися КТ-, ГП-, ГР-на активності та вміст ВГ, у порівнянні з показниками у тварин II групи із ЦД<sub>E</sub>.

У крові тварин, яким до раціону сумісно додавали цитрати хрому і цинку, спостерігалось вірогідне зниження загальної та індукцбельної NO-синтазної активності порівняно із тваринами з ЦД<sub>E</sub>. Механізм дії Хрому та Цинку на синтез NO може бути опосередкований через цитокіни (TNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), що синтезуються макрофагами. Крім цього, Cr і Zn можуть пригнічувати iNOS активність внаслідок безпосереднього модифікування ензимної активності через їх кофактори.

Таким чином, результати проведених наукових досліджень формують нові наукові уявлення щодо дії цитратів мікроелементів, синтезованих методом нанотехнології, на перебіг біохімічних процесів в організмі тварин за експериментального діабету. Вперше здійснено дослідження сумісного впливу цитратів хрому і цинку на особливості функціонування вуглеводного обміну, стану про/антиоксидантної та NO-синтазної систем в організмі щурів із стрептозотоцином індуктованим діабетом. З'ясовані оптимальні дози цитратів хрому (25 мкг/кг) і цинку (50 мг/кг) для коригування обмінних процесів в організмі тварин з експериментальним діабетом. Доведено, що досліджувані сполуки, синтезовані методом нанотехнології, можуть проявляти гіпоглікемічний ефект, пригнічувати анаеробний гліколіз, підвищувати концентрацію інсуліну і С-пептиду за цукрового діабету. З'ясовано, що застосування цитратів хрому і цинку призводить до зниження індукцбельної NOS активності та вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів в організмі тварин із стрептозотоциновим діабетом, що призводить до пригнічення розвитку оксидативно-нітрозативного стресу. Встановлені виражені антиоксидантні властивості досліджуваних сполук, що підтверджується нормалізацією активності антиоксидантних ензимів в крові та тканинах щурів за цукрового діабету.

Результати досліджень можуть використовуватися для теоретичного обґрунтування сумісного застосування сполук хрому і цинку для корекції метаболічних процесів в організмі тварин з експериментального індуктованим діабетом. Результати роботи можуть стати основою для розробки нових

гіпоглікемічних засобів для профілактики та лікування цукрового діабету і його ускладнень. Отримані результати дисертаційних досліджень використані при підготовці та написанні методичних рекомендацій “Живлення тварин та фізіолого-біохімічні процеси в організмі за дії цитратів мікроелементів”. Практичним результатом роботи стало розроблення способів сумісного застосування цитратів мікроелементів для профілактики та лікування цукрового діабету, на які отримано два патенти України на корисну модель.

Одержані в дисертаційній роботі результати впроваджені у навчальний процес на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка, кафедрі медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, а також кафедрі лабораторної медицини Львівська медична академія імені Андрея Крупинського.

**Ключові слова:** щури, експериментальний цукровий діабет, хром, цинк, цитрати, вуглеводний обмін, антиоксидантна система, оксидативний стрес, NO-синтази.

#### **Список публікацій здобувача за темою дисертації.**

1. **Слівінська О. М.,** Сеньків О. М., Іскра Р. Я. Антиоксидантна система у скелетних м'язах та крові щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія. 2016; 26: 5-10. *(Дисертантка провела дослідження ензимів АОС, здійснила аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*
2. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.,** Шатинська О. А., Сварчевська О. З., Сеньків О. М., Пилипець А. З. Метаболічні процеси у печінці щурів за експериментального діабету та вплив цитрату хрому. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015;12:161-166. *(Дисертантка провела дослідження активності ензимів вуглеводного обміну та АОС, проаналізувала результати та брала участь у написанні статті).*



3. Iskra R. Ya., **Slivinska O. M.**, Klymets H. V. Carbohydrate metabolism in blood and liver of rats with experimental diabetes and its correction by zinc citrate. *The Animal Biology*. 2016;18(3):46-52. *(Дисертантка виконала дослідження ензимів та метаболітів вуглеводного обміну, статистично опрацювала дані та брала участь у написанні статті).*
4. **Slivinska O. M.**, Iskra R. Ja. A complex influence of chromium and zinc citrates on antioxidant defense system in rats' organism with an experimentally induced diabetes mellitus. *Медична та клінічна хімія*. 2017;19(1):31-39. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготовку статті до друку).*
5. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.** Вплив цитрату хрому на вуглеводний обмін у крові щурів за стрептозотоцин індукованого діабету. *Медична хімія*. 2014; 3(60):16-19. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*
6. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.** Дія хром цитрату на про/антиоксидантний статус підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2015;70:25-30. *(Дисертантка виконала дослідження та брала участь у написанні статті).*
7. **Слівінська О. М.** Вплив цитрату цинку на антиоксидантний захист у печінці та підшлунковій залозі щурів за експериментального діабету. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017; 4(6): 189-193.
8. **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я. Коригувальний вплив цитратів хрому і цинку на NO-синтазну активність еритроцитів щурів із стрептозотоциновим діабетом. *The Animal Biology*. 2020;22(2):65-70. *(Дисертантка провела дослідження NO-синтазної активності, опрацювала дані та брала участь у написанні статті).*
9. **Slivinska O.**, Senkiv O., Iskra R. Antioxydant system in rats' liver and skeletal muscles during experimentally-induced diabetes and its correction with chromium citrate. *British Journal of Science and Education*. 2015;1(7):1119-1125.

*(Дисертантка провела визначення активності ензимів АОС, статистично опрацювала дані та підготувала статтю до друку).*

10. **Slivinska O. M.**, Iskra R. Ya. Scientific developments of Ukraine and EU in the area of natural sciences: Collective monograph. P. 2. Riga: Izdevniecība «Baltija Publishing»; 2020. Antioxydant system in rats' liver and skeletal muscles during experimentally-induced diabetes and its correction with chromium and zinc citrates: 649-663. *(Дисертантка провела дослідження і прийняла участь у написанні розділу).*
11. Спосіб профілактики цукрового діабету при комплексному використанні цитратів хрому та цинку: пат. 121254, Україна / **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я., Шатинська О. А. МПК А61К 33/00, А61Р 3/10 (2006.01); заявл. 26.06.2017, опубл. 27.11.2017, Бюл. № 22. *(Дисертантка провела дослідження активності ензимів вуглеводного обміну і АОС, проаналізувала дані, оформила патент).*
12. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А. Салига Н. О., Сварчевська О. З., Бучко О. М., Пилипець А. З., Сеньків О. М., Приймич Н. І. Живлення тварин та фізіологі-біохімічні процеси в організмі за дії цитратів мікроелементів: методичні рекомендації. Львів; 2016. 27с. *(Дисертантка брала активну участь в оформленні та написанні методичних рекомендацій).*
13. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Сушко О. О., Климець Г. В., Котик Б. І., Любас Н. М. Застосування цитратів мінеральних елементів у біології та медицині: методичні рекомендації. Львів; 2020. 26с. *(Дисертантка брала активну участь в оформленні та написанні методичних рекомендацій).*
14. **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я. Активність системи антиоксидантного захисту в крові щурів із експериментально індукованим діабетом і за впливу цитрату хрому. Тези IV Міжнародної науково-практичної конференції: Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології, Харків, 2014. 175. *(Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, оформила та написала тези).*

15. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Сеньків О. М. Вплив хром цитрату на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в скелетних м'язах щурів за експериментально індукованого діабету. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції: Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини, м. Львів, Біологія тварин. 2014; 16(3): 174. *(Дисертантка провела дослідження активності ензимів АОС, опрацювала статистичні дані, оформила тези).*
16. Іскра Р. Я., Сварчевська О. З., Салига Н. О., **Слівінська О. М.** Біохімічні процеси в організмі щурів за різних доз хрому(III) в раціоні. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, м. Київ, Український біохімічний журнал. 2014; 86(5):152-153. *(Дисертантка брала участь у опрацюванні результатів і написанні та оформленні тез).*
17. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Салига Н. О., Сеньків О. М.. Вплив хром цитрату на показники вуглеводного обміну та антиоксидантної системи в еритроцитах та гепатоцитах щурів за експериментально індукованого діабету. Матеріали міжнародної наукової конференції: Механізми функціонування фізіологічних систем, приуроченої до 70-ліття біологічного факультету та 230-ліття фізіології у Львівському університеті, Львів; 2014: 42-43. *(Дисертантка провела дослідження активності ензимів вуглеводного обміну та АОС, опрацювала статистичні дані, оформила тези).*
18. **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А., Іскра Р. Я. Оксидативно-нітративний стрес у щурів з експериментально-індукованим діабетом та його корекція цитратом хрому: Матеріали конференції-конкурсу молодих учених: Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015, Київ, 2015: 59. *(Дисертантка провела дослідження ензимів АОС і NO-синтазної системи, опрацювала статистичні дані, брала участь у написанні тез).*
19. **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А. Вплив цитратів цинку і магнію на вуглеводний обмін у крові та тканинах щурів з експериментальним цукровим діабетом. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та

- молодих вчених: Шевченківська весна: біологія, Київ; 2015: 182-184. *(Дисертантка брала участь у опрацюванні результатів і написанні тез).*
20. Климець Г. В., **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я. Вплив цитрату цинку на вуглеводний обмін в організмі щурів з експериментальним цукровим діабетом. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції: Актуальні проблеми фізіології тварин, м. Одеса, 2016:26-29. *(Дисертантка провела дослідження ензимів вуглеводного обміну, брала участь у опрацюванні результатів і написанні та оформленні тез).*
21. Iskra R., **Slivinska O.** Influence of Zinc Citrate on Oxidative and Nitrative Stress in rats' organism with experimentally induced diabetes mellitus. Joint Annual Meeting of the German Society for Minerals and Trace Elements with Zink-UK. Achen; 2017:55. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, аналіз статистичних даних та оформила тези).*
22. Іскра Р. Я., Понкало Л. І., Сушко О. О., **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А. Вплив цитратів ванадію, цинку та магнію на стан прооксидантної системи підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету. Міжнародна конференція: Бабенківські читання, Івано-Франківський національний медичний університет; 2017: 49. *(Дисертантка брала участь у опрацюванні результатів і написанні та оформленні тез).*
23. **Слівінська О.**, Іскра Р., Приймич В. Вплив цитратів хрому та цинку на вміст мікроелементів та вуглеводний обмін в організмі щурів з експериментальним діабетом. Матеріали XVII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених: Молоді учені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини, Львів. Біологія тварин. 2018; 20(4): 136. *(Дисертантка провела дослідження активності ензимів вуглеводного обміну та вмісту мікроелементів, опрацювала дані та оформила тези).*

## ANNOTATION

Slivinska O. M. Carbohydrate metabolism and antioxidant system in rats with experimental diabetes mellitus and their correction with Chromium and Zinc citrates. –

Qualificative research paper as a manuscript. The thesis for the Degree of Candidate of Biological Sciences (Doctor of Philosophy) in the specialty 03.00.04 – “Biochemistry” (Biological sciences). – Institute of Animal Biology of NAES Ukraine, Lviv, 2020.

Diabetes mellitus (DM), in addition to chronic hyperglycemia, is characterized by disorders of carbohydrate, lipid and protein metabolism, affecting human health and life expectancy. The component of the pathogenesis of diabetes mellitus and its specific and nonspecific complications is based on oxidative stress. The increase in the content of active forms of oxygen (AFO) under conditions of hyperglycemia, as well as the ability to interact with NO, forming cytotoxic peroxynitrite leads to multiple pathological changes in the functioning of signaling and metabolic pathways, to disorders of homeostasis of cells and organs under conditions of diabetes mellitus.

Therefore, the aim of the research was to elucidate the peculiarities of carbohydrate metabolism and the state of the pro/antioxidant system in the organism of laboratory rats with streptozotocin induced diabetes and the corrective effect on these processes of chromium and zinc citrates synthesized by the method of nanotechnology.

The research was conducted on white rats of the Wistar line weighting 150-170g, kept in vivarium conditions of the Institute of Animal Biology of NAES Ukraine at the appropriate temperature regime (20-25°C), humidity (40-45%) and lighting in compliance with ethical standards for experiments on rats according to “General Ethical Principles for Experiments on Animals”, approved by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2001) and consistent with the provisions of “The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, France, 1985) and protocol of the Commission on Bioethics of Institute of Animal Biology of NAES (No. 75 of 23.10.2018).

Three series of investigations were conducted. In the first and second series the effect of different doses of chromium and zinc citrates was investigated, and in the third series – the compatible action of these compounds in optimal doses on separate sections of metabolic processes in the organism of laboratory animals with experimental diabetes.

During the first two series of investigations rats were divided into four groups: 1<sup>st</sup> – control, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> – experimental, moreover, in the 2<sup>nd</sup> group there were animals with experimental diabetes mellitus. Animals of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> experimental groups in the first series of investigations within four weeks were consuming chromium citrate with water in amounts of 10 and 25  $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{kg}$  of body weight, and in the second series of investigations zinc citrate was added in amounts of 20 and 50  $\text{mg Zn}^{2+}/\text{kg}$  of body weight respectively. In the third series of investigations animals of the 3<sup>rd</sup> group were given chromium citrate with water to the diet in the amounts of 25  $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{kg}$  of body weight and zinc citrate in the amounts of 50  $\text{mg Zn}^{2+}/\text{kg}$  of body weight.

In order to induce an experimental diabetes mellitus animals of all experimental groups of the first, second and third series of investigations on the background of a 24-hour fasting on the 30<sup>th</sup> day from the start of the experiment the solution of streptozotocin (“Sigma”, the USA) in an amount of 65  $\text{mg}/\text{kg}$  was once injected intraperitoneally, which was diluted with citrate buffer (pH 4.5) with previous (15 min) intraperitoneal administration of nicotinamide in dose of 230  $\text{mg}/\text{kg}$ . Rats of the control group were injected a similar volume of solvent (citrate buffer with pH 4.5). The occurrence of hyperglycemia was observed as early as the 3<sup>rd</sup> day after the administration of streptozotocin. The duration of investigation of experimental diabetes mellitus was 10 days from the moment of diabetogenic substance administration. Hyperglycemia was confirmed by daily measuring of blood glucose collected from the tail vein using a portable glucometer (“Gamma-M”, Ukraine). Rats with the glucose concentration from 14  $\text{mmol}/\text{L}$  were used for the experiment. Slaughter of animals for biochemical investigations was performed on the 40<sup>th</sup> day of the study by decapitation under mild thiopental anesthesia.

The study of the activity of enzymes and substrates of carbohydrate metabolism, lipid peroxidation products, enzymes of the antioxidant system was performed in blood cells and tissues of skeletal muscles, liver, pancreas, as those involved in the processes of accumulation and utilization of glucose.

With the introduction of streptozotocin, which selectively affects the  $\beta$ -cells of the islets of the pancreas, experimental diabetes occurred, which was accompanied by

insufficient secretion of the hormone. This was confirmed by the results of our investigation, which showed a probable decrease in insulin and C-peptide levels and an increase in the concentration of glucose, glycosylated and total hemoglobin in the blood of rats with experimental diabetes mellitus.

Glucose metabolism is important for the regulation of insulin secretion in  $\beta$ -cells of the pancreas. Glucose is taken up by glucose transporters and is phosphorylated by glucokinase with the generation of ATP, which is the main driver of glucose-induced insulin secretion. Increase in the concentration of glucose in the blood of animals with experimental diabetes mellitus may be associated with both insufficient synthesis and release of insulin by  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans, and with some changes on the level of hormone receptor interaction with cells of insulin-sensitive tissues. These disorders can lead to a certain imbalance at the intracellular metabolic level of the target tissues of the hormone, in particular disruption of glucose utilization, which, accordingly, is reflected in the activity of the studied enzymes of carbohydrate metabolism.

As a result of conducted experiments in all series of investigation it was found that under conditions of experimental diabetes mellitus in the blood of rats there were revealed changes in carbohydrate metabolism indicators in blood and in animal tissues, including increased lactate dehydrogenase activity in erythrocytes, liver (however, a slight decreased in activity in the first series of investigation), skeletal muscles and pancreas and decreased glucose-6-phosphatedehydrogenase activity in erythrocytes, liver and skeletal muscles, however growth – in the pancreas.

The component of the pathogenesis of diabetes mellitus and its specific and nonspecific complications is based on oxidative stress. The sources of intensive formation of free radicals under the conditions of diabetes mellitus are non-enzymatic, enzymatic and mitochondrial pathways. Increased level of LPO products in diabetes mellitus may be associated with changes in the function of erythrocyte membranes and cells of other body tissues. It causes inhibition of AOS activity, which leads to the accumulation of superoxide radicals, which cause maximum lipid peroxidation and tissue damage in diabetes.

It has been found that under the conditions of diabetes mellitus in the blood and tissues of animals the content of LPO products was increasing. In addition, the system of antioxidant protection in the body of rats with experimental diabetes mellitus was undergoing changes. In particular, SOD activity was increasing in erythrocytes, while CAT, GPx and GR activities were decreasing. In the tissues of animals with experimental diabetes mellitus the activity of AOS enzymes was decreasing, in particular, in skeletal muscles – SOD, CAT, GPx, GR activities; in the liver – CAT, GPx and GR activities and RG content; in the pancreas – CAT, GPx and GR activities and RG content, but SOD activity was increasing.

The main mechanism of oxidative and nitrative stress in diabetes is a violation of the electron transport chain of mitochondria. The increase in the content of superoxide anion under conditions of hyperglycemia, as well as its ability during interaction with NO to form cytotoxic peroxynitrite leads to multiple pathological changes in the functioning of signaling and metabolic pathways, to disorders of homeostasis of cells and organs in diabetes.

Erythrocytes by synthesizing, transporting and releasing products of NO and ATP metabolism thereby control the bioavailability of NO for blood vessels. In erythrocytes of animals with experimental diabetes mellitus, a probable increase in total NOS and inducible NOS activity was found, while constitutive NOS activity did not change. Increased iNOS activity may be associated with increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and exposure to proinflammatory cytokines which activate expression of mRNA iNOS.

Understanding of the peculiarities of pathogenetic and therapeutic significance of the level of macro- and microelements in patients with diabetes is of great importance for the diagnostics, prevention and treatment of this disease. In particular, microelements are the most important catalysts of various biochemical processes, metabolism, play a significant role in the adaptation of the organism both in normal and in pathology. Chromium and Zinc are essential microelements that perform many physiological and biochemical functions in the body.

In experimental diabetes mellitus, the content of Chromium and Zinc in the tissues of rats was reduced, but with the addition of chromium and zinc citrates to the diet of



rats a probable increase in the content of both Chromium and Zinc in the liver and skeletal muscles was observed.

Citrates of microelements synthesized by nanotechnology have high biological activity, they are non-toxic, increase digestion, increase the activity of many enzymes and vitamins, so they are well absorbed by the body and used in metabolic processes. With the compatible action of chromium and zinc citrates in the blood of animals there was a probable decrease in glucose concentration, levels of glycosylated hemoglobin and total hemoglobin, however an increase in insulin and C-peptide, compared with animals with experimental diabetes mellitus. In addition, under the action of chromium and zinc citrates there was a probable decrease in lactate level in the blood, a decrease in lactate dehydrogenase activity in erythrocytes and tissues of skeletal muscles, but a probable increase in G-6-PDG activity in erythrocytes, tissues of liver and skeletal muscles, compared with animals with experimental diabetes mellitus.

Under the conditions of compatible addition of citrates of microelements to the rats diet, the content of LHP and TBA active products in blood plasma and tissues was probably reducing. The decrease in the content of LPO products indicates the inhibitory effect of the studied elements, with increasing of its consumption by animals, on the processes of lipid peroxidation in the blood, liver, muscles and pancreas, which are characterized by high metabolic activity.

By the action of chromium and zinc citrates the activation of the antioxidant system was revealed, in particular, SOD activity was decreasing in erythrocytes, but the content of reduced glutathione and GPx activity was increasing; in the skeletal muscles SOD, CAT and GR activities were increasing; in the liver and pancreas – SOD activity was decreasing, however CAT, GPx, GR activities and RG content were increasing, compared with the animals of the 2<sup>nd</sup> group with experimental diabetes mellitus.

In the blood of animals to which diet chromium and zinc citrates were added, a probable decrease in total and inducible NO-synthase activity was observed compared with animals with experimental diabetes mellitus. The mechanism of action of Chromium and Zinc on NO synthesis can be mediated by cytokines (TNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )

which is synthesized by macrophages. In addition, Cr and Zn can inhibit iNOS activity because of a direct modification of enzyme activity through their cofactors.

Thus, the results of conducted scientific investigations form new scientific ideas about the effect of citrates of microelements synthesized by the method of nanotechnology on the course of biochemical processes in animals with experimental diabetes. For the first time, a study of the compatible effect of chromium and zinc citrates on the functioning of carbohydrate metabolism, the state of pro/antioxidant and NO-synthase systems in rats with streptozotocin-induced diabetes has been carried out. Optimal doses of chromium (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and zinc (50  $\text{mg}/\text{kg}$ ) citrates have been determined in order to correct metabolic processes in animals with experimental diabetes. It has been proved that the studied compounds synthesized by the method of nanotechnology can have a hypoglycemic effect, inhibit anaerobic glycolysis, increase the concentration of insulin and C-peptide in diabetes. It has been found out that the use of chromium and zinc citrates leads to decrease in the inducible NOS activity and the content of lipid peroxidation products of animals with streptozotocin diabetes, which causes the inhibition of the development of oxidative and nitrosative stress. The significant antioxidant properties of the studied compounds have been defined, that is confirmed by normalization of the activity of antioxidant enzymes in the blood and tissues of rats in diabetes mellitus.

The results of research can be used for theoretical substantiation of the compatible use of chromium and zinc compounds for the correction of metabolic processes in animals with experimentally induced diabetes. The results of the scientific work can be the basis for the development of new hypoglycemic means for the prevention and treatment of diabetes mellitus and its complications. The obtained results of the thesis were used in preparation and writing of methodological recommendations “Animal nutrition and physiological and biochemical processes in an organism under the action of citrates of microelements”. The practical result of the work was the development of ways of compatible use of citrates of microelements for the prevention and treatment of diabetes mellitus, for which two patents of Ukraine for a utility model were obtained.

Obtained in the thesis results are implemented in the educational process at the Department of Biochemistry of Ivan Franko Lviv National University, Department of Medical Biology, Parasitology and Genetics of Danylo Halytsky Lviv National Medical University, as well as the Department of Laboratory Medicine of Higher Educational Communal Institution of Lviv Regional Council “Andrei Krupynskyi Lviv Medical Academy”.

**Key words:** rats, experimental diabetes mellitus, Chromium, Zinc, citrates, carbohydrate metabolism, antioxidant system, oxidative stress, NO-synthase.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	24
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	32
1.1.           Порушення метаболічних процесів за цукрового діабету	32
1.1.1.       Поширеність та фізіолого-біохімічна характеристика типів цукрового діабету	32
1.1.2.       Механізм виникнення цукрового діабету	34
1.1.3.       Біохімічні особливості оксидативно-нітрозативного стресу за цукрового діабету	36
1.1.3.1.     Механізм виникнення оксидативно-нітрозативного стресу за гіперглікемії	36
1.1.3.2.     Значення оксиду нітрогену в організмі	37
1.1.3.3.     Роль NO-залежних механізмів при виникненні ендотеліальних дисфункцій та функціонування еритроцитів за цукрового діабету	40
1.2.           Цинк та його значення в організмі людей і тварин	42
1.2.1.       Фізіологічна роль Цинку у функціонуванні організму	42
1.2.2.       Вплив Цинку на вуглеводний обмін в організмі	46
1.2.3.       Дія Цинку на систему антиоксидантного захисту	47
1.2.4.       Вплив Цинку на розвиток оксидативно-нітрозативного стресу в організмі	48
1.3.           Хром та його значення в організмі людей і тварин	52
1.3.1.       Хром у навколишньому середовищі та організмі людини	52
1.3.2.       Механізм дії Хрому на активацію інсуліну	53
1.3.3.       Вплив сполук Хрому на оксидативний стрес	55
1.3.4.       Дія сполук Хрому на метаболізм у людей із цукровим діабетом і без нього	58
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	61

2.1.	Об'єкт та умови дослідження	61
2.2.	Схема досліджень	61
2.3.	Сполуки, які використовувалися у дослідженнях	64
2.3.1.	Стрептозотоцин	64
2.3.2.	Цитрати цинку і хрому	65
2.4.	Отримання лізатів еритроцитів та гомогенатів досліджуваних тканин	65
2.5.	Визначення активності ензимів та метаболітів вуглеводного обміну	66
2.6.	Визначення концентрації загального протеїну	70
2.7.	Визначення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів	70
2.8.	Визначення показників системи антиоксидантного захисту	71
2.9.	Визначення NO-синтазної активності	74
2.10.	Імуноензимний метод визначення вмісту інсуліну та С-пептиду	76
2.11	Визначення вмісту мікроелементів Хрому і Цинку	77
2.12	Статистична обробка результатів	77
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ		79
3.1.	Вплив цитрату хрому в кількості 10 і 25 мкг/кг маси тіла на біохімічні процеси в організмі щурів із стрептозотоциновим діабетом	79
3.1.1.	Вплив цитрату хрому на показники вуглеводного обміну в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом	79
3.1.2.	Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів АОС в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату хрому	84

3.1.3.	Стан NO-синтазної системи в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом за впливу цитрату хрому	93
3.1.4.	Вміст Хрому в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату хрому.	95
3.2.	Вплив цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг маси тіла на біохімічні процеси в організмі щурів із стрептозотоциновим діабетом	97
3.2.1.	Вплив цитрату цинку на показники вуглеводного обміну в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом	97
3.2.2.	Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів АОС в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату цинку	102
3.2.3.	NO-синтазна активність в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом за впливу цитрату цинку	110
3.2.4.	Вміст Цинку в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату цинку.	112
3.3.	Сумісний вплив цитратів хрому (25 мкг/кг м.т.) і цинку (50 мг/кг м.т.) на біохімічні процеси в організмі щурів із стрептозотоциновим діабетом	115
3.3.1	Дослідження сумісного впливу цитратів хрому та цинку на показники вуглеводного обміну в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом	116
3.3.2.	Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів АОС в організмі щурів з експериментальним діабетом та при сумісній дії цитратів хрому і цинку.	119

3.3.3.	Активність NO-синтаз в еритроцитах тварин з експериментально індукованим діабетом та за сумісного впливу цитратів хрому і цинку.	125
3.3.4	Вміст інсуліну і С-пептиду в крові щурів з експериментальним діабетом та за сумісної дії цитратів цинку і хрому	126
3.3.5	Вміст Хрому і Цинку в організмі щурів з експериментальним діабетом та за сумісної дії цитратів хрому та цинку	128
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ		132
ВИСНОВКИ		152
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		153
ДОДАТКИ		190

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЦД – цукровий діабет

ЦД<sub>Е</sub> – експериментальний цукровий діабет

АФО – активні форми Оксигену

АФН – активні форми Нітрогену

NOS – NO-синтази

cNOS – конститутивна NO-синтаза

iNOS – індукцйбельна NO-синтаза

ГПЛ – гідропероксидази

ТБК-активні продукти – вторинні продукти ПОЛ, які утворюються в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

СОД – супероксиддисмутаза

КАТ – каталаза

ГП – глутатіонпероксидаза

ГР – глутатіонредуктаза

ВГ – відновлений глутатіон

МАРК1 – мітогенактивована протеїнкіназа-1

TNF- $\alpha$  – фактора некрозу пухлин  $\alpha$

$\bullet\text{O}^{2-}$  – супероксидний радикал

ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит

AGE – кінцеві продукти неензиматичного глікозилювання

PKC – протеїнкіназа C



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Цукровий діабет – це метаболічне захворювання, що характеризується хронічною гіперглікемією, яка виникає внаслідок дефекту секреції або дії інсуліну [1]. Це захворювання може спричинити багато ускладнень, включаючи серцево-судинні захворювання, інсульт, хронічні захворювання нирок, виразки стопи, пошкодження очей, нервів та когнітивні порушення [2]. Причому при гострих ускладнення можуть виникати діабетичний кетоацидоз, гіперосмолярний гіперглікемічний стан або смерть [3].

ЦД, крім гіперглікемії, характеризується зміною вуглеводного, ліпідного і протеїнового обмінів, що впливає на здоров'я та тривалість життя [4]. Розвитку ЦД передують порушення окремих ланок вуглеводного обміну, зокрема глікемії та розв'язок толерантності до глюкози. Гіперглікемія, що розвивається за ЦД, ініціює вироблення мітохондріями активних форм Оксигену (АФО), що призводить до функціонування патологічних метаболічних шляхів: поліолового шляху утилізації глюкози; збільшеного утворення кінцевих продуктів посиленого глікозилювання; гексозамінового патологічного шляху.

На сьогодні є дані, що підтверджують роль оксидативного стресу (ОС) в патогенезі діабету 1 і 2 типу [5]. Вільні радикали, які утворюються внаслідок ОС при діабеті при неензиматичній глікації протеїнів, окисненні глюкози та підвищеному пероксидному окисненні ліпідів (ПОЛ), призводять до пошкодження ензимів, клітинних механізмів, а також до інсуліно-резистентності [5]. Згідно з дослідженнями [6], ліпіди й аполіпропротеїнові компоненти ЛПНЩ, які утворюють окиснені нерозчинні агрегати, що містять поперечні зшивки, утворених між гідроксильним радикалом та мономерами білка апо-В, відповідають за окиснювальне пошкодження при діабетичних ускладненнях. При цукровому діабеті основними джерелами ОС є мітохондрії. Під час окиснювального метаболізму в мітохондріях частина кисню відновлюються до води, а решта - перетворюється на вільний радикал ( $O\bullet$ ), що є важливою активною формою Оксигену, яка перетворюється на інші реактивні форми, такі як  $ONOO-$ ,

ОН та  $H_2O_2$  [7]. Сигналізація інсуліну модулюється АФО/АФН двома способами. З одного боку, у відповідь на інсулін, АФО/АФН синтезуються для здійснення його фізіологічної функції, а з іншого боку, АФО і АФН здійснюють негативну регуляцію щодо інсулінової сигналізації, з метою розвитку резистентності до інсуліну, що є фактором ризику для діабету 2 типу.

Вважається, що у виникненні та прогресуванні ускладнень діабету вільні радикали отримали головну роль завдяки своїй здатності пошкоджувати ліпіди, білки та ДНК [8].

Крім цього за гіперглікемії, крім ОС, розвиваються ендотеліальні дисфункції [9, 10], які проявляються за відсутності синтезу або біодоступності нітроген оксиду (NO) [11], внаслідок зменшення його продукції та / або АФО - опосередкованої інактивації [12].

Підвищення вмісту АФО за умов гіперглікемії, а також здатність взаємодіяти з NO, утворюючи цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних і метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету.

Тому виявлення ранніх порушень вуглеводного обміну та стану про/антиоксидантної системи в організмі і запровадження профілактичних прийомів має велике медичне й соціальне значення. При правильній організації скринінгу в групах пацієнтів, у яких висока ймовірність виявлення цих порушень, успішна первинна профілактика ЦД на етапі предіабету може сприяти значному зниженню ускладнень.

У багатьох дослідженнях було виявлено прямий зв'язок між метаболізмом деяких макро- і мікроелементів та протіканням ЦД. Встановлено, що ці елементи можуть відігравати певну роль у патогенезі та прогресуванні цього захворювання [13, 14]. Зокрема, Хром необхідний для нормального обміну вуглеводів, є кофактором для інсуліну і компонентом фактора толерантності до глюкози (GTF), який відіграє роль у гомеостазі глюкози [15]. Дослідниками було встановлено, що концентрація хрому була значно знижена в крові, однак збільшена у сечі хворих на ЦД 2 типу у порівнянні з контрольними особами обох статей [16].

Цинк відіграє важливу роль у метаболізмі глюкози [17] та сприяє утилізації глюкози м'язовими та жировими клітинами. Він необхідний як кофактор для функції внутрішньоклітинних ензимів, які можуть брати участь у обміні протеїнів, ліпідів та глюкози. Цинк може бути залучений до регуляції механізму трансдукції сигналів, започаткованого рецепторами інсуліну, та синтезу рецепторів інсуліну [18]. Цинк має двофазну дію, оскільки він необхідний для зберігання інсуліну в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози та зв'язування гормону з клітинами, хоча високі його концентрації можуть призвести до зниження секреції інсуліну [19].

Хром і Цинк є важливими регуляторами процесів пероксидного окиснення ліпідів і активності АОС в організмі. Відомо, що Хром за певних умов може як ініціювати пероксидні процеси, так і підвищувати активність АОС [20]. Цинк є структурною частиною ключового антиоксидантного ензиму, такого як супероксиддисмутаза, а дефіцит елемента погіршує синтез цього ферменту, що призводить до посилення ОС [20].

Зважаючи на прогнозований ріст захворюваності на цукровий діабет та високу розповсюдженість і смертність від ускладнень, цікавим є факт, що дефіцит Хрому і Цинку розглядається як потенційний фактор ризику розвитку цих станів [13].

Тому важливо було з'ясувати особливості вуглеводного обміну та стану про/антиоксидантної системи в організмі лабораторних тварин з експериментально індукованим діабетом та впливу на ці процеси цитратів хрому та цинку.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження, що увійшли до дисертаційної роботи, є частиною науково-дослідної роботи лабораторії біохімії адаптації та онтогенезу тварин Інституту біології тварин НААН згідно з завданнями «З'ясувати дію цитрату хрому та цитрату цинку на метаболічні процеси в організмі щурів за експериментально індукованого діабету» (Ф. ДР № 0111U006159) та «З'ясувати комплексну дію цитратів цинку і хрому на систему антиоксидантного захисту та показники вуглеводного обміну в організмі щурів за умов гіперглікемії» (Ф. ДР № 0116U001407). Здобувачка, як

одна із співвиконавців завдань, досліджувала зміни метаболічних процесів в організмі щурів за умов експериментального діабету і впливу цитратів цинку та хрому.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи - з'ясувати біохімічні особливості впливу цитратів хрому і цинку, синтезованих методом нанотехнологій, на вуглеводний обмін і стан про/антиоксидантної системи в організмі щурів із стрептозоточин індукованим діабетом для розробки нових підходів корекції їх порушень.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Дослідити окремий та сумісний вплив цитрату хрому та цитрату цинку на вміст метаболітів і активність ензимів вуглеводного обміну в організмі щурів із стрептозоточин індукованим діабетом.

2. Дослідити окремий та сумісний вплив цитрату хрому та цитрату цинку на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантної системи в організмі щурів із стрептозоточин індукованим діабетом.

3. Дослідити окремий та сумісний вплив цитрату хрому та цитрату цинку на активність NO-синтаз в організмі щурів із стрептозоточин індукованим діабетом.

4. Вивчити вплив цитрату хрому та цитрату цинку в різних дозах на вміст Хрому і Цинку у тканинах щурів із стрептозоточин індукованим діабетом.

5. З'ясувати сумісний вплив цитрату хрому і цитрату цинку на вміст інсуліну та С-пептиду в крові щурів з експериментально індукованим діабетом.

**Об'єкт дослідження** – біохімічні процеси в крові та тканинах щурів за стрептозоточин індукованого цукрового діабету та впливу цитратів хрому і цинку в різних дозах.

**Предмет дослідження** – мінеральний та вуглеводний обмін, про/антиоксидантна та NO-синтазна система в крові та тканинах щурів за умов

експериментального цукрового діабету та впливу цитратів хрому і цинку в різних дозах.

**Методи дослідження:** біохімічні (визначення концентрації глюкози, рівня глікозильованого та загального гемоглобіну, гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів, активності ензимів вуглеводного обміну антиоксидантної та NO-синтазної систем), атомно-абсорбційні (визначення вмісту Хрому і Цинку), імуноензимні (визначення концентрації інсуліну і С-пептиду) та статистичні (середнє арифметичне та його похибка, вірогідність) методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Результати наукових досліджень формують нові наукові уявлення щодо дії цитратів мікроелементів, синтезованих методом нанотехнології, на перебіг біохімічних процесів в організмі тварин за експериментального діабету. Вперше здійснено дослідження сумісного впливу цитратів хрому і цинку на особливості функціонування вуглеводного обміну, стану про/антиоксидантної та NO-синтазної систем в організмі щурів із стрептозотоцин індукованим діабетом. З'ясовані оптимальні дози цитратів хрому і цинку для нормалізації основних показників обмінних процесів в організмі тварин з експериментальним діабетом. Доведено, що досліджувані сполуки, синтезовані методом нанотехнології, можуть проявляти гіпоглікемічний ефект, пригнічувати анаеробний гліколіз, підвищувати концентрацію інсуліну і С-пептиду за цукрового діабету. З'ясовано, що застосування цитратів хрому і цинку призводить до зниження індукбельної NOS активності та вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів в організмі тварин із стрептозотоциновим діабетом, що призводить до пригнічення розвитку оксидативно-нітративного стресу. Встановлені виражені антиоксидантні властивості досліджуваних сполук, що підтверджується нормалізацією активності антиоксидантних ензимів в крові та тканинах щурів за цукрового діабету.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати досліджень можуть використовуватися для науково-практичного обґрунтування сумісного застосування сполук хрому і цинку для корекції метаболічних процесів в

організмі тварин з експериментального індукованим діабетом, а також стати основою для розробки нових гіпоглікемічних засобів для профілактики та лікування цукрового діабету і його ускладнень. Отримані результати дисертаційних досліджень використані при підготовці та написанні методичних рекомендацій “Живлення тварин та фізіолого-біохімічні процеси в організмі за дії цитратів мікроелементів”. Практичним результатом роботи стало розроблення способів сумісного застосування цитратів мікроелементів для профілактики та лікування цукрового діабету, на які отримано два патенти України на корисну модель.

Одержані в дисертаційній роботі результати впроваджені у навчальний процес на кафедрах біологічної хімії та патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та на кафедрі лабораторної медицини Львівської медичної академії імені Андрея Крупинського.

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто опрацьована література за темою дисертаційної роботи, виконано експериментальну частину роботи (на базі Інституту біології тварин НААН України), проведено аналіз отриманих результатів та їх обговорення, статистичне опрацювання матеріалу, оформлено та написано дисертаційну роботу. Дисертантом спільно з науковим керівником – д.б.н. Іскрою Р. Я. обґрунтовано концепцію дослідження, сформульовано тему, основні положення, мету і завдання, розроблені методичні підходи, сформульовано висновки, які виносяться на захист дисертаційної роботи. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, використано фактичний матеріал досліджень автора.

**Апробація результатів досліджень.** Основні результати дисертаційної роботи були представлені на міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2014, 2015); науково-практичній конференції молодих учених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2014, 2018); IV міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (Харків, 2014); міжнародній

науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 2014); конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології 2015» (Київ, 2015); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин» (Одеса, 2015); XIV міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Шевченківська весна: біологія» (Київ, 2015); Joint Annual Meeting of the German Society for Minerals and Trace Elements (GMS) with Zinc-UK and Zinc-Net COST Training School (Аахен, Німеччина, 2017)

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 23 праці з них 10 статей, з яких 8 опубліковані у фахових виданнях України, що включені до міжнародних наукометричних баз даних, 2 методичні рекомендації, 1 патент на корисну модель, 10 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Дисертацію викладено на 198 сторінках комп'ютерного тексту (основна частина – 154 сторінки), проілюстровано 11 рисунками та 23 таблицями. Список використаних джерел налічує 385 найменувань, з яких 304 латиницею.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1.Порушення метаболічних процесів за цукрового діабету

**1.1.1. Поширеність та фізіолого-біохімічна характеристика типів цукрового діабету.** Цукровий діабет є одним з найпоширеніших хронічних захворювань сучасного суспільства та головною проблемою для здоров'я людей майже у всіх країнах світу. За визначенням Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я цукровий діабет відноситься до глобальних медико-соціальних проблем. Його поширеність стрімко зростає за останні кілька десятиліть [21]. Крім того, прогнози на наступні 10-12 років вказують на те, що поширеність цукрового діабету продовжуватиме зростати та може досягти епідемічних показників до 2030 року – 439 мільйонів осіб, що становить 7,7% від загального населення планети [21]. Таке збільшення захворювання в основному пов'язане зі зростанням поширеності ожиріння та наслідків діабету 2-го типу (T2DM), однак кількість захворюваності на цукровий діабет 1 типу (T1DM) також зростає [22].

Основні епідеміологічні та інтервенційні дослідження виявили, що хронічна гіперглікемія є основним джерелом ураження органів і тканин в організмі із ЦД [23]. Гіперглікемія залишається основним фактором ризику розвитку хронічних ускладнень діабету. Однак важливий внесок здійснюють генетичні фактори ризику, причому деякі з них є загальними для всіх мікросудинних ускладнень (діабетична ретинопатія, нейропатія та нефропатія) [24]. Є дані літератури, які свідчать про те, що оксидативний стрес і, відповідно, ендотеліальна дисфункція можуть бути ключовими посередниками шкідливого впливу гіперглікемії [25].

Цукровий діабет – це гетерогенна група захворювань, що виникають на ґрунті абсолютної чи відносної інсулінової недостатності та об'єднуються наявністю спільного симптому – гіперглікемії.



Є два типи цукрового діабету. При будь-якому з них суть захворювання зводиться до підвищення концентрації глюкози в крові.

Діабет 1 типу – це аутоімунне захворювання, при якому  $\beta$ -клітини підшлункової залози не синтезують достатньої кількості інсуліну – гормону, який бере участь в утилізації глюкози з крові з метою одержання енергії. Дефіцит інсуліну порушує баланс між ліпогенезом та ліполізом в бік переваги останнього. Цей процес призводить до утворення великої кількості жирних кислот, які надходять в печінку і обумовлюють її жирову інфільтрацію [26]. При окисненні жирних кислот утворюються кетоніві тіла ( $\beta$ -гідроксималяна, ацетооцтова кислоти та ацетон), які не можуть повністю "згоріти" в циклі Кребса. У виведенні з організму кетонівих тіл беруть участь, окрім нирок, також легені – з'являється запах ацетону у видихуваному повітрі, змінюється характер дихання [27]. У зв'язку з підвищенням рівня кетонівих тіл у крові розвивається кетонемія та кетонурія, які призводять до розвитку метаболічного кетоацидозу зі значним зниженням рівнів рН і бікарбонатів у сироватці крові. Крім того, в циклі Кребса внаслідок дефіциту інсуліну пригнічується окиснення лактату, збільшується кількість молочної кислоти, тобто виникає гіпер-лактацидемія. Таким чином, розвивається змішаний метаболічний ацидоз [28-31].

Цукровий діабет 2 типу – це порушення вуглеводного обміну, спричинене інсулінорезистентністю та відносною інсуліновою недостатністю або переважним дефектом секреції інсуліну з інсулінорезистентністю. Коли  $\beta$ -клітини нездатні виробляти достатньої кількості інсуліну для подолання резистентності до гормону, порушуючи толерантність до глюкози, прогресує діабет 2 типу. Також виникають аномалії синтезу інших гормонів, а саме зниження секреції інкретин глюкагонподібного пептиду 1 (GLP-1) що призводить до гіперглюкагонемії [32-36]. Надлишкова вага і ожиріння є основними факторами, що сприяють розвитку резистентності до інсуліну, порушення толерантності до глюкози (наприклад, збільшення лептину, зниження адипонектину і підвищення глюкагону), підвищена концентрація цитокінів, фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ), а також молекулярні дефекти протеїнів, що передають сигнали інсуліну (підвищення

експресії Rad-протеїну і роз'єднуючого протеїну (UPC-1) – інгібіторів тирозинкінази інсулінового рецептора), зниження концентрації й активності внутрішньоклітинних транспортерів глюкози – GLUT-4 [37-40]. Паралельні зміни в  $\beta$ -клітинах часто супроводжуються компенсаторною гіперінсулінемією з аномальною секреторною динамікою. Коли секреція інсуліну вже недостатня для подолання резистентності до інсуліну, прогресує зниження транспортування глюкози за діабету 2 типу. Зниження функцій  $\beta$ -клітин пов'язане з хронічною гіперглікемією, впливом неетерифікованих жирних кислот, окиснювальним стресом і запаленням [41-43]. Пацієнти з діабетом 2 типу, як правило, мають панкреатичну  $\alpha$ -клітинну дисфункцію, що призводить до збільшення глюкагонової секреції в присутності гіперглікемії [44].

Інсулінорезистентність (ІР) – це загальний патофізіологічний стан, при якому у пацієнтів спостерігається знижена чутливість до інсуліну і як наслідок – непереносимість глюкози у печінці, жировій тканині і скелетних м'язах [45]. ІР є серйозною глобальною проблемою, оскільки є причиною багатьох хронічних захворювань, в тому числі цукрового діабету 2 типу, серцево-судинних, ожиріння, цирозу печінки [46], атеросклерозу, гіпертонії та інсульту [47].

**1.1.2. Механізм виникнення цукрового діабету.** Відомо, що гіперглікемія підвищує концентрацію вільних радикалів у плазмі крові [48,49]. Неконтрольована гіперглікемія може виникати внаслідок декількох причин [50,51]: а) підвищений гліколіз [52]; б) міжклітинна активація сорбітолу (поліолу) [53]; в) аутоокислення глюкози [54], г) залежна активація NAD(P)H-оксидази [55], протеїнкінази С (PKC), д) активація гексозамінового шляху [56], е) збільшення внутрішньоклітинного утворення кінцевих продуктів неензиматичного глікозилювання (AGE) [57], є) збільшення експресії рецепторів для AGE та його активуючих лігандів [57] та ж) глікації неензиматичних протеїнів [58].

Гіперглікемія призводить до інтенсифікації гліколізу, ЦТК, що зумовлює інтенсифікацію роботи електронтранспортного ланцюга мітохондрій. Мембранний потенціал зростає до критичної межі, що призводить до блокування

III комплексу мітохондрій, і електрон із коензима Q передається на молекулу кисню з утворенням  $\bullet\text{O}^{2-}$ . За умов гіперглікемії мітохондріальна супероксиддисмутаза неспроможна диспропорціонувати надмірну кількість  $\bullet\text{O}^{2-}$ . За наявності у клітині NO та  $\bullet\text{O}^{2-}$  відбувається утворення пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ) – надзвичайно цитотоксичної сполуки. Зростання вмісту  $\text{ONOO}^-$  призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу, який супроводжується пероксидним окисненням ліпідів, посттрансляційною модифікацією протеїнів, розривами ДНК, змінами у клітинному сигналюванні.

Було виявлено, що у відповідь на ушкодження ДНК активними формами Оксигену й  $\text{ONOO}^-$  активується репараційний комплекс, до складу якого входить ензим PARP. Даний ензим полі-(ADP) – рибозилує низку протеїнів ядра та ензим гліколітичного циклу гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH), який може транслокуватись у ядро та з нього [59, 60]. Пригнічення активності GAPDH поряд із високим вмістом глюкози у клітині призводить до накопичення проміжних продуктів катаболізму глюкози в гліколітичному ланцюзі та її розщеплення до стадії утворення гліцеральдегід-3фосфату, з відповідним пригніченням наступної стадії, що і призводить до активації поліольного, гексозамінного шляхів, накопичення продуктів та попередників неензиматичного глікозилювання й активації протеїн кінази C (PKC) [59].

Внутрішньоклітинні кінцеві породукти глікації (advanced glycation end products, AGEs), як правило, досить швидко деградують шляхом протеолізу, а для позаклітинних, які є довгоживучими, існують спеціальні механізми видалення. Так, для видалення довгоживучих AGEs (білків позаклітинного матриксу і крові), які також можуть накопичуватись і з віком, існує декілька механізмів, включаючи ензиматичний репараційний механізм. Однак основним механізмом є видалення таких протеїнів і їхня протеолітична деградація за участі специфічних рецепторів до AGEs – RAGEs [59]. Такі рецептори виявлено в ендотеліальних клітинах, моноцитах, макрофагах та ін. [61]. При взаємодії AGEs із рецептором відбувається активація цілого каскаду сигнальних механізмів, що призводить до зростання експресії та виділення ряду прозапальних цитокінів ( $\text{TNF-}\alpha$ , інтерлейкінів 1, та 6),

вазоконстрикторів – ендотеліну-1, молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1) та ростових факторів, які порушують функцію судин та сприяють передчасному розвитку атеросклерозу, запальним процесам [61]. Таким чином, рівень AGEs та їхніх попередників, як і вміст продуктів поліольного шляху, вважаються маркерами ступеня ушкоджень тканин при діабеті.

### **1.1.3. Біохімічні особливості оксидативно-нітрозативного стресу за цукрового діабету.**

**1.1.3.1. Механізм виникнення оксидативно-нітрозативного стресу за гіперглікемії.** Синтез високоенергетичних сполук, що відбувається за біохімічних, біофізичних та механічних функцій організму, поєднується з генерацією потенційно цитотоксичних АФО [62]. АФО можуть атакувати, денатурувати або модифікувати структурні та функціональні молекули і тим самим викликати цитотоксичність, пошкодження тканин і їхню дисфункцію. Оксидативний стрес залучений у патогенез тканинних ушкоджень та їх дисфункцій за багатьох захворювань людини, включаючи діабет [63-65]. АФО реакційно впливають на ліпіди, вуглеводи, протеїни та ДНК, що призводить до цитотоксичності та дисфункції організму [66]. Окрім того, АФО реагують з оксидом нітрогену (NO) – головною сигнальною молекулою з різноманітними біологічними функціями [67]. Це може призвести до функціонального дефіциту NO й утворення високорактивних форм нітрогену, таких як пероксинітрит [68] або пероксинітритна кислота [69]. У свою чергу, останні агенти можуть атакувати, денатурувати або модифікувати різні структурні та функціональні молекули [70]. Наприклад, пероксинітрит може вступати в реакцію з тирозиновими або цистеїновими залишками протеїнів, що зумовлюють синтез нітротирозину або нітроцистеїну, які розглядаються як наслідок взаємодії АФО з NO [63].

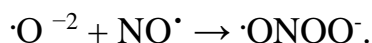
У дослідженнях *in vivo* та *in vitro* продемонстровано помітне зниження синтезу NO і активності NO-синтази (NOS) у тварин з діабетом, а також у культивованих ендотеліальних та мезангіальних клітин, підданих симуляції

гіперглікемією [71-75]. Окрім того, оксидативний стрес, що є загальною ознакою діабету, потенційно може призвести до АФО-опосередкованої інактивації NO, тим самим посилюючи ефект зниження активності NOS. NO є найбільш потужним ендогенним вазодилататором і відіграє важливу роль у регуляції ниркового і системного судинного тиску, ниркового кровотоку, швидкості клубочкової фільтрації і тканинної перфузії [76,77]. Неконтрольована гіперглікемія незмінно супроводжується посиленням ниркового кровотоку і швидкості клубочкової фільтрації [78,79].

Неконтрольований діабет характеризується гіперглікемією і підвищенням кількості циркулюючих вільних жирних кислот. АФО реагують зі жирними кислотами з отриманням ліпопероксидів, які, в свою чергу, можуть атакувати різні молекули, зокрема протеїни, для вироблення продуктів ліпооксидації [80]. Крім того, АФО реагують з глюкозою для отримання високореактивних карбонільних сполук, які, в свою чергу, можуть реагувати з вільною аміногрупою залишків лізину, що призводить до утворення глікозильованих протеїнів [81].

**1.1.3.2. Значення оксиду нітрогену в організмі.** Оксид нітрогену (NO) в організмі може виконувати не тільки аутокринні, але й паракринні функції, що пов'язано з високим коефіцієнтом дифузії NO (у 1,4 рази вище, ніж у кисню [82,83] та здатністю стабілізуватися шляхом включення до динітрозильних комплексів Феруму або до S-нітрозотіолів, які надалі можуть вивільняти NO. Такі комплекси утворюють у тканинах фізіологічно активне депо NO. Це дає можливість його транспортувати на відстані, які перевищують в декілька разів розміри клітин. Молекула NO містить непарну кількість електронів, один з яких має неспарений спін, що перетворює її у високореактивний радикал, який вільно проникає крізь біологічні мембрани та легко реагує з іншими речовинами [83]. Основними первинними мішенями NO вважаються іони та комплекси перехідних металів. У зв'язку з чим NO може брати участь у регуляції активності будь якого біополімера, що утворює такі комплекси, у тому числі металозалежних ензимів. Цей взаємозв'язок може призвести як до активації, так і до інгібування ензиматичної активності. NO легко вступає у зв'язок з простетичною гемовою

групою та ферум-сульфурними комплексами низки ензимів та протеїнів, таких як гуанілатциклаза, власне самих NO-синтаз, гемоглобіну, мітохондріальних ензимів (НАДН-убіхінонредуктази, цитохромів), ензимів циклу Кребса (цис-аконітази), ензимів синтезу протеїнів та ДНК [84,85]. Друга важлива мішень для NO – це протеїни, які містять SH-групи [86,87]. NO відіграє роль ефективного каталізатора утворення дисульфідних містків. Завдяки взаємодії з SH-групами NO може регулювати важливі для клітини процеси, як біосинтез протеїну, мітохондріальне дихання, апоптоз [88]. Нарешті, третя важлива мішень для оксиду нітрогену – АФО. NO взаємодіє з супероксидним аніон-радикалом, з утворенням пероксинітриту [89]:

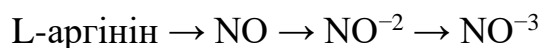


Останній за токсичними характеристиками в декілька разів перевищує сам NO. Середній час життя пероксинітриту у фосфатному буфері при pH 7,4 та 37° С становить 1-2 с, тому він може мігрувати у тканинах [90].

Пероксинітрит – сильний окиснювач, здатний окиснювати NH- та SH-групи протеїнів, що призводить також до інактивації  $\alpha 1$ -інгібітора протеїназ, тканинного інгібітора металопротеїназ-1,  $\text{Mn}^{2+}$ -СОД і  $\text{Fe}^{2+}$ -СОД [90]. Відомо також, що за наявності пероксинітриту або продуктів його розпаду, утворюються вільні радикали глутатіону, у результаті чого останній із антиоксиданта перетворюється в прооксидант, який ініціює процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Пероксинітрит викликає розриви ниток ДНК та посилює утворення 8-гідроксидезоксигуанозину, інгібує мітохондріальне дихання [89]. Утворення пероксинітритів є істотним елементом у багатьох патофізіологічних процесах.

Головними шляхами утворення оксиду нітрогену вважають NO-синтазну активність, а також ензиматичні та неензиматичні реакції відновлення нітрат- і нітрит-іонів.

Наявність NO-синтазного механізму забезпечує ендогенний синтез NO, який в кінцевому результаті окиснюється до нітрит- та нітрат-іонів:



У той же час з'ясовано, що один із продуктів перетворення NO нітрит-іон може доволі ефективно знову перетворюватись у NO [91,92]. У зв'язку з цим нітрити називають основним внутрішньосудинним сховищем NO [93].

В організмі NO синтезується клітинами з L-аргініну [94,95]. Цей процес є окиснювальною реакцією, яка каталізується NO-синтазою (NOS), що приєднує молекулярний кисень до кінцевого атома нітрогену в гуанідиновій групі L-аргініну. Ензими, які каталізують продукцію більшої частини NO, унікальні за складністю організації, включають рекордну кількість різноманітних кофакторів: флавінмононуклеотид, флавінаденіндинуклеотид, гем та кальцій-кальмодулін, а також три субстати – аргінін, кисень та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат [94].

Ізоформи NOS є продуктами різних генів. Нейрональні (nNOS) та ендотеліальні (eNOS) ізоферменти експресуються конститутивно та відповідають за продукцію малих кількостей (наномолі) NO. Вони постійно знаходяться у цитоплазмі (nNOS є цитозольними, eNOS – мембрано-зв'язаними), залежать від концентрації Кальцію та кальмодуліну, максимально активні при вмісті Кальцію близько 1 мМ. До конститутивних NO-синтаз належить також ізоферменти, які імуноцитохімічно виявляються у мітохондріях різних клітин (mtNOS). Припускають їхню участь у фізіологічній регуляції окиснювального фосфорилування та продукції АТФ [96].

При імуногістохімічному дослідженні eNOS виявляється, головним чином, в ендотелії судин мікроциркуляторного русла, nNOS – у нервових клітинах сплетення Ауербаха [97]. Оксид нітрогену, що утворюється за участю конститутивних NOS, здійснює, головним чином, місцеву регуляцію, активуючи клітинний ензим гуанілатциклазу, що призводить до утворення цГМФ. Останній знижує рівень вільного  $Ca^{2+}$  та активує кіназу легкого ланцюга міозину, викликаючи дилатацію судин. Цьому сприяє пряма активація  $K^+$  каналів [98].

Індуцибельна NOS з'являється у клітинах тільки після індукції їх бактеріальними ендотоксинами та деякими медіаторами запалення. Цей процес може провокуватися бактеріальними ліпополісахаридами, деякими

ендотоксинами та цитокінами, такими як інтерлейкін-1, -2,  $\gamma$ -інтерферон, фактор некрозу пухлин та ін. [99].

Оксид нітрогену, що виробляється під впливом nNOS і eNOS, при деяких формах патології, поряд із регуляторною, чинить і протекторну (захисну) дію, інгібує адгезію лейкоцитів до стінки судин та впливає на утворення факторів росту, а також чинить антимітогенну та антипроліферативну дію [98]. Функціональна активність індукцибельної NO-синтази у 100-1000 разів вища за активність конститутивної та не залежить від надходження іонів  $Ca^{2+}$  до клітини, тому іNOS називається кальцій-незалежною, а її активація супроводжується підвищенням генної транскрипції. Шкідливим є надвиробництво оксиду нітрогену, що виробляється активацією іNOS [99-101]. Надмірний синтез NO може призвести до розвитку нітрозативного стресу, викликаного реактивними видами Нітрогену, насамперед пероксинітритом [102,103]. Останній викликає нітрування і нітрозилування протеїнів, пероксидне окиснення ліпідів, пошкодження ДНК, і в кінцевому підсумку призводить до загибелі клітин [104].

**1.1.3.3. Роль NO-залежних механізмів при виникненні ендотеліальних дисфункцій і функціонування еритроцитів за цукрового діабету.** Для цукрового діабету (ЦД) характерні повільні прогресуючі пошкодження як малих (мікроангіопатія), так і великих (макроангіопатія) судин. Класичним тріо діабетичних мікроангіопатій є ретинопатія, нефропатія і нейропатія. Більшість епідеміологічних досліджень виявили, що хронічна гіперглікемія є основною причиною пошкодження судин під час цукрового діабету. Передбачається, що негативні наслідки підвищення рівня глюкози в крові проявляються в інтенсифікації оксидативного стресу та розвитку ендотеліальної дисфункції [105]. Ендотеліальна дисфункція проявляється у відсутності синтезу або біодоступності NO [106] внаслідок зменшення його продукції та /або АФО, синтезованими або глікозилуванними протеїнами, або безпосередньо з ендотелію судин [107].

Деякі автори вказують на існування NO-залежних сигналів в еритроцитах і роль гемоглобіну в метаболізмі NO [10,108]. Раніше еритроцити розглядалися як основний поглинач і депо NO. Однак у клітинах виявлено функціонально активні



ізоформи ензимів, які структурно і функціонально нагадують eNOS і iNOS [109-111]. Відомо, що NO, який продукується еритроцитами, бере участь у деформації клітин, що забезпечує їх проходження крізь мікросудини [112]. Крім того, NO може дифундувати з еритроцита в плазму, де він інгібує активацію і агрегацію тромбоцитів, а також адгезію і міграцію лейкоцитів [113].

Еритроцити відіграють важливу роль у підтримці пулу NO в крові. Надлишковий NO дифундує з плазми в клітини, де за участю гемоглобіну перетворюється в стабільні продукти. Взаємодія NO з оксигемоглобіном призводить до утворення нітратних аніонів і метгемоглобіну. Також нітрити можуть взаємодіяти з оксигемоглобіном [114]. Відомо, що в еритроцитах відновлення нітрит-іонів у NO каталізується електронно-донорними системами, які включають НАДН, НАДФН, флавопротеїни та дезоксигемоглобін. Ця реакція сприяє еритроцит-залежній вазодилатації при гіпоксії, що часто супроводжує цукровий діабет [114]. Крім цього, NO може зв'язуватися з групою гему дезоксигемоглобіну утворюючи нітрозил гемоглобіну (HbNO), а при зв'язуванні з тіловою групою глобіну – утворюється S-нітрозогемоглобін (HbSNO), що є вазодилатором, активність якого регулюється  $O_2$  [115]. Дослідженнями деяких авторів було підтверджено, що С-пептид стимулює вихід NO ендотелію шляхом активації ендотеліальної NO-синтази, регульованої кальмодуліном [116]. Реакцію активності  $Na^+/K^+$ -АТР-ази під час додавання С-пептиду можна спостерігати в еритроцитах та ниркових трубчастих клітинах. Покращення активності  $Na^+/K^+$ -АТР-ази пов'язане із збільшенням здатності до деформації еритроцитів і поліпшенням їх реологічних властивостей.

## **1.2. Цинк та його значення в організмі людей і тварин.**

**1.2.1. Фізіологічна роль Цинку у функціонуванні організму.** За поширенням в організмі людини Цинк займає друге місце після Феруму [117]. В організмі людини міститься 2-3 г цинку, і майже 90% знаходиться у м'язах та кістках [118]. Інші органи, також містять виражені концентрації Цинку: простата,

печінка, шлунково-кишковий тракт, нирки, шкіра, легені, мозок, серце і підшлункова залоза [119-121]. Тридцять відсотків від загального вмісту Цинку в організмі міститься в кістковій тканині, внаслідок резорбції якої може поповнюватися вміст мікроелемента у крові [123,124]. Цільна кров містить цинк у концентрації 600–800 мкг/100 мл, причому основна частка мікроелемента (85 %) міститься в еритроцитах, у плазмі виявляється 12 %, а в лейкоцитах - 3 % вмісту Цинку в крові [125]. Деякі клітини організму мають здатність накопичувати Цинк у більших концентраціях, ніж інші клітини [126]. Так, наприклад, значна кількість його акумулюється в  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса, де цей мікроелемент бере участь у формуванні гексамерних комплексів інсуліну в секреторних гранулах [127]. Окрім  $\beta$ -клітин, Цинк нагромаджують клітини базальних відділів кишкових крипт (клітини Панета), епітелію кінцевих відділів передміхурової залози, сітківки ока, нейрони головного мозку (гіпокампа), гранулоцити крові і кісткового мозку [127]. Концентрація Цинку в цих клітинах, в середньому, на два-три порядки вища, ніж вміст мікроелемента в інших клітинах організму.

Цинк, як і інші метали, потрапляє в організм людини і тварин через шлунково-кишковий тракт із їжею і кормом. У процесі травлення хімічний елемент вивільняється у вигляді катіонів і всмоктується в тонкому кишечнику, звідти потрапляє в кров і через ворітну вену надходить до печінки, а потім — у системний кровообіг та переноситься до інших органів і тканин. У плазмі крові, де Цинк зв'язаний, головним чином, з альбуміном, становить лише 0,1 % від загального вмісту цього мікроелемента в організмі [128]. Ця частка Цинку використовується для швидкого забезпечення потреб тканин.

В організмі, на клітинному рівні 30-40 % Цинку локалізується в ядрі, 50 % в цитозолі, а решта частина асоціюється з мембранами [129]. У клітині за нормальних умов вільного Цинку немає, тому компарменталізація і його розподіл у клітині чітко контролюється у фізіологічному діапазоні. Це досягається за допомогою протеїнів транспортерів і металотіонеїнів (МТ) [130,131].

Цинк належить до найбільш значущих і незамінних для життєдіяльності людини мікроелементів. Здатність  $Zn^{2+}$  утворювати ліганди з органічними

молекулами пояснює широкий спектр його біологічних функцій. Елемент зв'язується з ензимами, гормонами, вітамінами та впливає на такі важливі процеси, як кровотворення, розмноження, ріст і розвиток, обмін протеїнів, жирів і вуглеводів [132].

Цинк бере участь у діяльності понад 100 ензимів, серед яких карбоксипептидаза, оксидоредуктаза, трансфераза, алкогольдегідрогеназа, піруваткарбоксилаза, РНК- і ДНК-полімерази [133].

Транспортери цинку (протеїни ZnT і Zrt/Irt-подібні ZIP-протеїни) відіграють важливу роль у екзо- й ендоцитозі, буферизації і компактизації цинку [134]. МТ протеїни – це група розчинних низькомо-лекулярних протеїнів, які транспортують Цинк у цитозолі [135]. ZIP и ZnT цинкові транспортери належать до трансмембранних протеїнів, які контролюють концентрацію Цинку у клітині. ZnT (ZnT1-10) беруть участь у використанні цитозольного Цинку, транспортуючи його у внутрішньоклітинні органели або позаклітинний простір, в той час як ZIP збільшує концентрацію цитозольного Цинку, транспортуючи його із зовні клітини, або із клітинних органел (рис. 1).

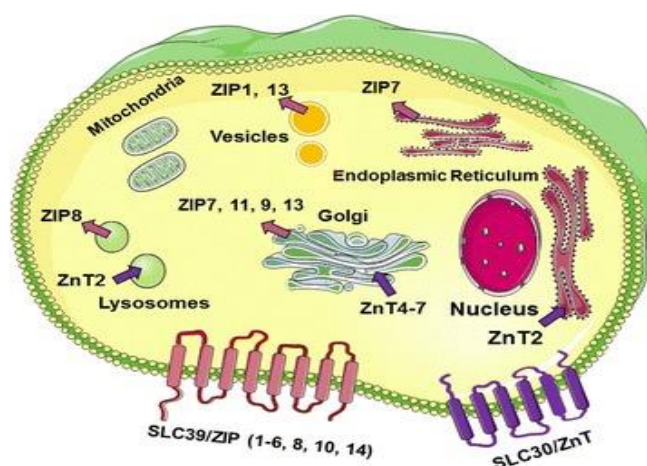


Рис. 1.1. Клітинна і субклітинна локалізація цинкових транспортерів ZIP и ZnT [136].

Транспортер Цинку ZnT8, який є продуктом гена *SLC30A8*, опосередковано здійснює накопичення Цинку в гранули інсуліну панкреатичних  $\beta$ -клітин і має вирішальне значення для синтезу, зберігання і дії інсуліну [137,138]. Цинк відіграє

фізіологічну роль для зберігання інсуліну в формі неактивного гексамеру цинк-інсуліну у секреторних гранулах підшлункової залози [137,139]. Коли гексамер цинк-інсулін вивільняється у кров, зміна рН призводить до дисоціації комплексу в біоактивний мономер інсуліну [140].

У дослідженнях було встановлено, що вміст  $Zn^{2+}$  у підшлунковій залозі хворих на цукровий діабет є значно нижчий, в той час у печінці не було виявлено зміни кількості цього мікроелементу, що прямо вказує на участь Цинку в запасанні інсуліну клітинами підшлункової [25].

На сьогодні день вважається доведеним, що біосинтез і зберігання інсуліну регулюється катіонами Цинку і Кальцію [141]. Біосинтез інсуліну відбувається в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози із попередників – пре-проінсуліну і проінсуліну. При відщепленні сигнальної послідовності із пре-проінсуліну утворюється проінсулін, який транспортується у комплекс Гольджі, де він секвеструється в  $Zn^{2+}$ - і  $Ca^{2+}$  збагачені везикули у формі цинк- і кальцій-вмісних гексамерних комплексів які позначаються як  $(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(Proin)_6$ . В секреторних везикулах після відщеплення С-пептиду трипсин- і карбоксипептидазо-подібними ензимами  $(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(Proin)_6$  перетворюється в гексамер інсуліну,  $(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(In)_6$ . Комплекс гексамерів  $(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(In)_6$  є формою збереження неактивного гормону, який в подальшому перетвориться в мономер інсуліну [25].

Після синтезу в ендоплазматичному ретикулумі проінсулін транспортується в комплекс Гольджі, де формуються незрілі секреторні «проінсулінові гранули». Як проінсулін, так й інсулін зв'язані із  $Zn^{2+}$ . Відомо, що утворення проінсулінових гексамерів з Цинком є необхідним етапом його процесінгу в нерозчинні інсулін-Zn кристали [25,129]. Відповідно, достатня кількість  $Zn^{2+}$  в  $\beta$ -клітинах, особливо в інсулінових гранулах, необхідні для коректної гексамеризації і процесінгу інсуліну. Панкреатичні  $\beta$ -клітини експресують більшу частину відомих Zn-транспортних протеїнів [137], які підтримують гомеостаз Цинку, необхідний для забезпечення цим мікроелементом всіх клітинних протеїнів, наприклад Zn-залежних ензимів і факторів транскрипції. Встановлено, що як кофактор  $Zn^{2+}$  не тільки бере участь у процесі синтезу й зберігання інсуліну, але й вивільняючись в

позаклітинний простір після секреції інсуліну є сигнальною молекулою для  $\alpha$ -клітин [142].

Встановлено, що за умов діабету порушується обмін Цинку, особливо в  $\beta$ -клітинах панкреатичних острівців [143]. Розвиток діабету супроводжується дегрануляцією інсулоцитів і втратою Цинку [144]. Це явище слугувало підтвердженням положення про роль Цинку в інкреторній функції підшлункової залози [145].

Відомо, що іони  $Zn^{2+}$  імітують низку ефектів інсуліну: стимулюють транспорт і окиснення глюкози, сприяють перетворенню останньої у триацилгліцероли, що пригнічує процес ліполізу [132]. Дефіцит Цинку інгібує процес зв'язування інсуліну з гепатоцитами, що призводить до формування печінкової недостатності. Цинк також необхідний під час синтезу колагену та загоєння ран [146].

Іони  $Zn^{2+}$  беруть участь у формуванні клітинного імунітету, а їх недостатність призводить до зниження захисних властивостей організму [147]. Цинк має широкий спектр дії — від впливу на захисний бар'єр шкіри до генної регуляції утворення лімфоцитів, а його недостача в організмі може призводити до імунодефіцитних станів [148]. Окрім того, Цинк безпосередньо впливає на функціональну активність лімфоцитів та інших лейкоцитів крові [149,150].

**1.2.2. Вплив Цинку на вуглеводний обмін в організмі.** В останній час у дослідження метаболічних процесів, що пов'язані з інсулінорезистентністю і ЦД 2 типу, виявили біохімічну і фізіологічну роль Цинку і протеїнів, які транспортують його у клітини при захворюваннях, пов'язаних з аномаліями клітинної сигналізації [151]. Відповідно, Цинк і протеїни, які його переносять, стали потенційними терапевтичними мішенями для корекції патологічних станів, пов'язаних з порушенням метаболізму. Наприклад, Цинк у раціоні і протеїни-транспортери, впливають на обмін Цинку в організмі, беруть участь у метаболічному гомеостазі в периферичних тканинах (скелетні м'язи, печінка), які реагують на інсулін [151].

Цинк, як відомо, стимулює гліколіз і пригнічує глюконеогенез [152-154]. Дослідження *in vitro* довели, що Цинк збільшує активність гліколітичних ензимів фосфоглюкокінази (ФФК) і піруваткінази (ПК) залежно від концентрації та часу інкубації [155,156]. Синтез лактату, який відображає активність фосфоглюкокінази, стимулювався Цинком [156]. Однак вплив Цинку та інсуліну не був адитивним, а попередня обробка елементом запобігала стимуляції гліколітичних ензимів інсуліном. Крім того, в клітинах, оброблених Цинком, спостерігалася прогресуюча активація ERK2 / MAPK1 (мітоген-активована протеїнкіназа-1) [155]. Однак дослідження *in vitro* з використанням гепатоцитів виявило, що при сублетальних концентраціях наночастинки ZnO стимулюють як глюконеогенез, так і глікогеноліз, що суперечить результатам попередніх досліджень [157].

Такі гормони, як інсулін, кортикотропін, соматотропін, гонадотропіни є цинк-залежними [132]. Цинк є інгібітором формування та трансформації еритроцитів у їх гемолізовані форми, а також стабілізатором клітинних плазматичних мембран проти дії вірусної інфекції та токсинів. Найважливішою є роль Цинку в процесі синтезу та секреції інсуліну. Цинк використовується  $\beta$ -клітинами для акумуляції та секреції гормону [158]. Розвиток ЦД характеризується втратою  $\beta$ -клітинами здатності акумулювати  $Zn^{2+}$  [159-161]. Відомо, що іони  $Zn^{2+}$  імітують низку ефектів інсуліну, а саме стимулюють транспорт та окиснення глюкози [162], сприяють перетворенню останньої на тригліцероли, що пригнічує процес ліполізу [163]. Дефіцит Цинку призводить до порушення синтезу та секреції нормальної фізіологічної молекули інсуліну. Циркуляція в крові недостатньо конвертованого малоактивного гормону ініціює розвиток тканинної інсулінорезистентності (з одного боку). Дефіцит Цинку пригнічує процес зв'язування інсуліну з гепатоцитами, що призводить до формування печінкової ІР (з іншого боку) [164-167].

**1.2.3. Дія цинку на систему антиоксидантного захисту.** Цинку притаманні антиоксидантні властивості, що сприяє корекції пероксидного

окиснення ліпідів у мембранах клітин (у складі Zn-залежної супероксид-дисмутази) [168].

Антиоксидантні властивості Цинку були досліджені *in vitro*, а також на тваринах і людях *in vivo*. Гіпоцинкемія та гіперцинкурія, як відомо, характерні для пацієнтів із 1 і 2 типом цукрового діабету, а добавки Цинку є корисними для відновлення рівня Цинку в плазмі крові [169-171]. Рівень ТБК-активних продуктів, маркерів оксидативного стресу, у плазмі крові пацієнтів з діабетом 1 типу та 2-го типу, значно зменшується при додаванні Цинку 30 мг/добу протягом 3-6 місяців [169,172]. Було встановлено, що рівень ТБК-активних продуктів був збільшений у тварин із цукровим діабетом і значно знижувався після додавання Цинку [173,174]. Відомо, що рівень Цинку у плазмі крові має негативну кореляцію з рівнем ТБК-активних продуктів як у пацієнтів з ожирінням, так і у пацієнтів із діабетом 2 типу [175].

Активність антиоксидантного ензиму селен-залежної глутатіон-пероксидази також була знижена у пацієнтів із діабетом 1 типу та нормалізувалася при додаванні Цинку 30 мг/добу [172]. Однак у пацієнтів з діабетом 2 типу суттєвих змін в антиоксидантній активності цього метало-ензиму не спостерігалось [169].

У дослідженнях на тваринах було встановлено, що добавки Цинку підвищують чутливість до інсуліну та антиоксидантний статус [172,176]. Крім того було встановлено, що у тварин із експериментально індукованим діабетом активності антиоксидантних ензимів каталази, глутатіонпероксидази і супероксиддисмутази, зменшуються, у порівнянні із контрольними тваринами [173, 177]. Додавання Цинку цим тваринам відновлює активність ензимів і збільшує синтез глутатіону [173,177]. Добавки Цинку викликають значну індукцію антиоксидантної системи в тканинах нирок, печінки і серця у тварин із індукованим діабетом [174,177-182].

**1.2.4. Вплив Цинку на розвиток оксидативно-нітрозативного стресу в організмі.** Оксидативний стрес можна визначити як надмірне вироблення

активних форм Оксигену / Нітрогену (АФО/АФН), відомих як прооксиданти, та / або дефіцит ензиматичних та неензиматичних антиоксидантів, які беруть участь у детоксикації ROS / RNS [183]. Надмірний оксидативно-нітрозативний стрес, як правило, можна вважати як причиною, так і наслідком численних патологічних станів, таких як рак, нейродегенеративні та серцево-судинні захворювання, діабет [184,185]. Для боротьби з надмірним оксидативним стресом раніше були використані різні природні чи синтетичні антиоксиданти для запобігання або послаблення патологічного переходу [184,186,187].

Цинк належить до двовалентних металів, як двовалентний катіон ( $Zn^{2+}$ ) він стійкий і безпосередньо не зазнає змін в окисно-відновних реакціях.  $Zn^{2+}$  не може віддавати або отримувати вільні електрони, тому що він є окисно-інертним; він не вважається антиоксидантом у традиційному розумінні. Натомість  $Zn^{2+}$  може функціонувати як ефективна кислота Льюїса і часто інтегрується чотирма лігандами в чотиригранний масив із бічними ланцюгами амінокислот, таких як аспарагінова кислота, глутамінова кислота, цистеїн та гістидин [188-190]. Численні дослідження пов'язують індукцію ензимів, що беруть участь в антиоксидантному захисті з антиоксидантними потенціалами дії вільних або лабільних форм  $Zn^{2+}$  [191]. Однак не легко розрізнити, чи дана дія отримана від Цинку чи  $Zn^{2+}$ . Антиоксидантні властивості Цинку були вивчені раніше [191], а потім були виявлені його протизапальні ефекти [192,193]. Парадоксально, але оксидативний стрес, який може бути опосередкований як дефіцитом Цинку, так і надлишком  $Zn^{2+}$ , деякі науковці пропонують тісно пов'язувати з нейродегенеративними змінами при хворобі Альцгеймера [194] та у нейронних культурах [195,196]. Смерть нейронів, що виникає внаслідок внутрішньоклітинного надлишку  $Zn^{2+}$ , який був мобілізований та перерозподілений у мозку [197].

Роль Цинку як антиоксиданту (Рис.1.2), або прооксиданту не є однозначною через різноманітність та складність дії  $Zn^{2+}$  [191].



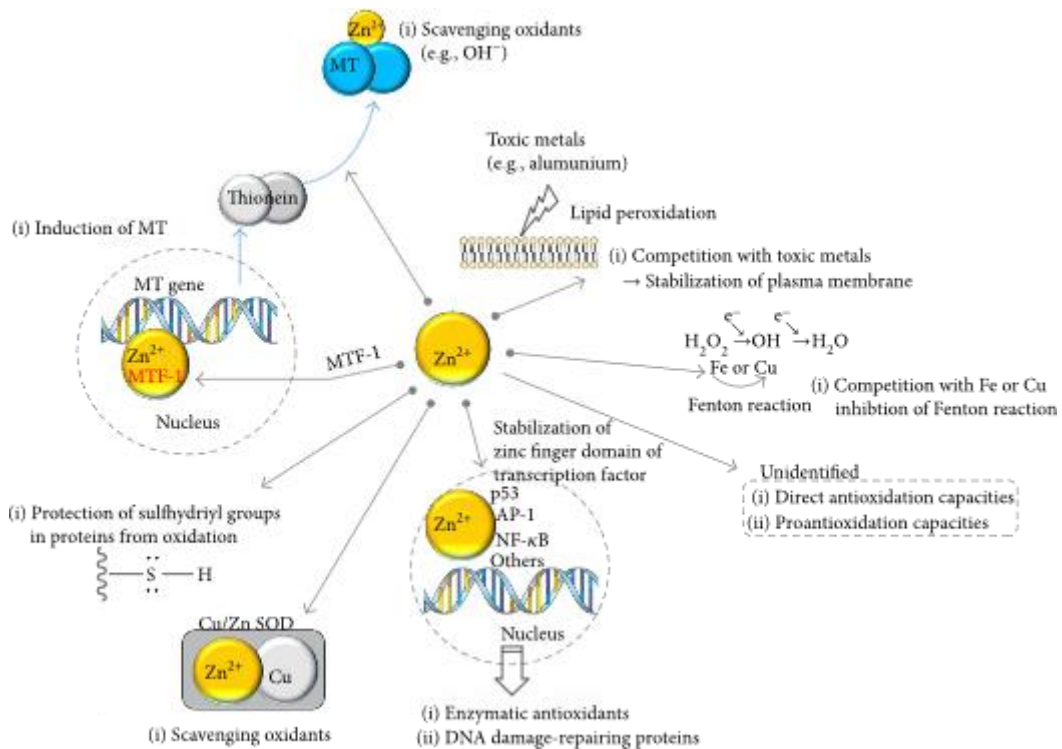


Рис.1.2. Використання цинку як антиоксиданту [191]. AP-1: активатор білка 1; Cu: мідь; Fe: залізо; MT: металотіонеїн; MTF-1: фактор транскрипції-1, що реагує на метал; NF-κB: ядерний фактор каппа-В; p53: пухлинний супресор p53; СОД: супероксиддисмутаза.

Йони  $Zn^{2+}$  є гідрофільними і не можуть проникати крізь цитоплазматичну мембрану та мембрани внутрішньоклітинних компарментів. Рівні  $Zn^{2+}$  в цілому організмі та клітинах контролюються металотіонеїнами (MT), транспортерами  $Zn^{2+}$  (родина розчинних носіїв 30A, ZnTs) та імпортерами  $Zn^{2+}$  (родина розчинних носіїв 39A, ZIPs) [198]. ZnTs полегшують мобілізацію  $Zn^{2+}$  у зворотному напрямку до ZIPs [135]. Окрім ZIPs, в мобілізації  $Zn^{2+}$  по всій клітинній мембрані беруть участь інші мембранні транспортери-протеїни, включаючи деякі типи кальцієвих каналів, рецептор до глутамату, рецептор до ацетилхоліну та канал транзиторного потенціалу (TRP) [199].

Є деякі докази того, що надмірне окиснення / пероксидне окиснення відбувається насамперед *in vivo* в тканинах тварин, із дефіцитом Цинку [191]. Сам Цинк не є окиснювально-відновним, і, таким чином,  $Zn^{2+}$  не взаємодіє

безпосередньо з АФО або з вуглецево-орієнтованими вільними радикалами [191].

Можливі джерела АФО при низьких рівнях Цинку можуть бути пов'язані зі:

1) зниженням активності ключових антиоксидантних ензимів, таких як Cu / Zn-специфічна СОД;

2) порушення індукції МТ  $Zn^{2+}$ ;

3) нижчий захист вільних сульфгідрильних груп у протеїнах, оскільки  $Zn^{2+}$  може захищати їх від окиснення, як це було виявлено в  $\delta$ -амінолевулінат-дегідратази, дигідроортази, цитоскелетному протеїні тубуліні та ДНК- зв'язуючих з протеїнах цинкових пальців [191]. Взаємодія  $Zn^{2+}$  із сульфгідрильними групами може бути залучена до регуляції ензиматичної активності за рахунок запобігання внутрішньомолекулярному утворення дисульфїду, що спричиняє стеричні перешкоди та конформаційні зміни [191]. Примітно, що Zn-МТ не захищають всі сульфгідрильні групи від окисного стресу, оскільки  $Zn^{2+}$  виділяється із комплексу  $Zn^{2+}$ -МТ після реакції з  $OH^-$  та  $O^{2-}$  [191];

4) менша конкуренція з відновно-активними іонами металів, які беруть участь у окиснювальній реакції.  $Zn^{2+}$  може конкурувати з Купрумом або Ферумом за певні типи місць зв'язування, завдяки подібності в їх координаційній хімічній будові [200], і тим самим пригнічувати їх здатність передавати електрони в певному середовищі і викликати вироблення АФО. Наприклад, конкуренція  $Zn^{2+}$  з Купрумом або Ферумом в клітинній мембрані призводить до пригнічення активності NADPH-оксидази, іншого джерела продукції  $O^{2-}$  і  $H_2O_2$  [201], і послаблює хронічне запалення та гіперглікемію [202];

5) дисфункція мітохондрій та / або ЕР внаслідок недостатності Цинку;

б) непряма участь в окиснювальних реакціях.  $Zn^{2+}$  зв'язується вибірково з NADPH, але не з NADH. Отже,  $Zn^{2+}$  може інгібувати NADPH-опосередковану систему окиснення певних речовин [203].

Отже,  $Zn^{2+}$  виконує роль стабілізатора макромолекул та біологічних мембран та мінімізує їх окиснювальне / пероксидативне ураження [204], однак, є деякі винятки.

Очевидно, що Цинк діє як антиоксидант, оскільки декілька факторів транскрипції [205] можуть регулюватися  $Zn^{2+}$  та антиоксидантними молекулами (глутатіон, СОД, глутатіон-S-трансфераза, гемеоксигеназа-1), а також індукуватися фактором транскрипції Nrf2, який входить у родину еритроїдного ядерного фактора -2 (рис. 1).

Цинк (Zn) як важливий метал, є кофактором численних ензимів та факторів транскрипції [206,207]. Оскільки Zn є потужним антиоксидантом [208], дефіцит Zn є причиною посилення окиснювальної шкоди в багатьох органах, включаючи серце [209] внаслідок зменшення кардіогенної антиоксидантної здатності [210]. Встановлено, що дефіцит Zn посилює гіпертонію у гіпертонічних щурів, і це зумовлює ризик виникнення атеросклерозу [211]. І гіпертонія, і атеросклероз безпосередньо ініціюють або прискорюють ішемічне ураження серця. Додаток Цинку запобігає серцевій токсичності від недіабетичного окиснювального стресу. При адаптації серця до окиснювального стресу Zn тимчасово перерозподіляється в організмі, що призводить до низького рівня Zn у сироватці крові та підвищення рівня у серці на ранній стадії серцевого патогенезу [212].

Епідеміологічні дослідження виявили, що за низьких концентрацій Zn у питній воді виникає ризик розвитку діабету 1 типу [213]. У дослідженнях на тваринах показано, що деякі хелатні сполуки Zn викликали діабет у деяких видів ссавців, наприклад кроликів, мишей та хом'яків шляхом руйнування  $\beta$ -клітин [214], а також, що дефіцит Zn провокував підвищення рівня глюкози у схильних до діабету експериментальних тварин [215]. Тому дефіцит Zn можна вважати фактором ризику для розвитку діабету. Діабет також значно погіршує гомеостаз Zn.

Дослідниками встановлено, що додаток Цинку сприятливо впливає на контроль глікемії та показники ліпідів у хворих на цукровий діабет [216].

При дослідженнях на японських перепелах, яких годували дієтою, що містила L-аргінін (5 мг / кг) та Цинк (60 мг / кг) протягом 30 днів було встановлено ефективно зменшення окиснювального стресу, посилення антиоксидантної здатності у крові та покращення маси яєць тварин [217].

### 1.3. Хром та його значення в організмі людей і тварин.

*1.3.1. Хром у навколишньому середовищі та організмі людини.* Хром – мікроелемент, що міститься у земній корі і морській воді, існує в навколишньому середовищі у вигляді сполук хрому з іншими елементами. Тривалентний хром ( $\text{Cr}^{3+}$ ) знаходиться у формі гідроксокомплексів в біологічних системах і є життєво необхідним для людини і тварин [218].

Всмоктування хрому відбувається в шлунково-кишковому тракті шляхом слабкої дифузії [219].

Після потрапляння у кровоносне русло, мікроелемент розподіляється між органами і тканинами нерівномірно: найбільша його концентрація виявлена у нирках, м'язах, печінці, селезінці, легенях, щитоподібній залозі і кістках [220]. Загальна кількість Хрому в організмі людини становить 0,4—6 мг [221]. Варто зазначити, що вміст цього елемента у новонароджених є вищим, ніж у дорослих. На засвоєння Хрому в шлунково-кишковому тракті впливає низка чинників. Так, абсорбцію Хрому підсилюють вітаміни групи В та С [218,222], а також солі Магнію і Кальцію. Також слід зазначити, що вміст  $\text{Cr}^{3+}$  у тканинах тварин значно знижується з віком: в одних тканинах — протягом періоду інтенсивного росту, в інших — у критичні фізіологічні періоди [218].

Виведення надлишку Хрому із організму людини відбувається переважно із потом, жовчю, грудним молоком та сечею [223]. У дослідженнях встановлено [224], що при фізичному навантаженні у людей, а також, при деяких захворюваннях (інфекціях, цукровому діабеті) та стресових ситуаціях відбувається посилене виділення Хрому з сечею.

Нестача та надлишок Хрому в організмі людини викликає низку порушень життєво важливих процесів метаболізму. Брак Хрому може виявлятися у клінічно здорових осіб: у підлітковому віці, в період вагітності та лактації, а також у похилому віці, що пояснюється особливостями фізіологічних процесів [225]. Окрім того, нестача Хрому може сприяти розвитку цукрового діабету, атеросклерозу, периферичної нейропатії, затримці росту, порушенню вищої

нервової діяльності, зниженню імунітету, зменшенню тривалості життя, порушенню репродуктивної функції у чоловіків тощо [219].

**1.3.2. Механізм дії Хрому на активацію інсуліну.** У дослідженнях *in vivo* та *in vitro* встановлено, що Хром підсилює дію інсуліну у складі органічного комплексу — фактора толерантності глюкози. Біологічно активною формою Хрому в організмі є хроمودулін (LMWCr) — олігопептид до складу якого крім мікроелементу ще входять гліцин, цистеїн, глютамін і аспарагін [225].

У синтезі LMWCr бере участь Хром, який транспортується трансферином. Трансферин складається на 30 % із Феруму, а решта — становлять інші йони [227]. При такому співвідношенні, між Хромом і Ферумом виникає конкуренція за зв'язування з трансферином. Так при додаванні до їжі людям Хрому у кількості 200 мкг/добу протягом 8 тижнів, призводить до незначного зменшення

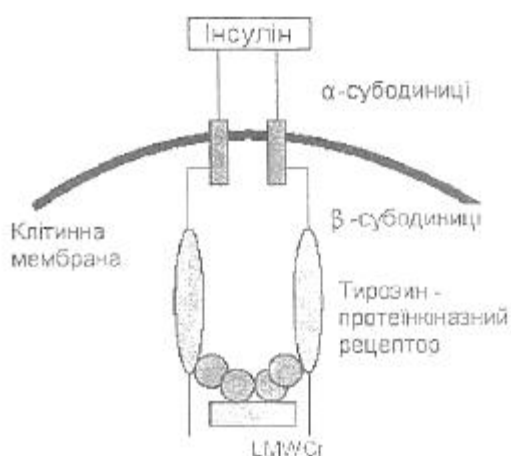


Рис. 1.3. Рецептор інсуліну [226].

Феруму у трансферині [228]. Інші дослідження показали, що зв'язування трансферином Феруму, який конкурентно витісняє Хром, може сприяти виникненню діабету у людини при спадковому гемохроматозі [229].

Встановлено, що LMWCr без тривалентного Хрому або при наявності інших іонів неефективний [230]. Є повідомлення, що Хром інгібує фосфотирозин фосфатазу — ензим, який відщеплює фосфат від рецептора інсуліну, що

призводить до зниження його чутливості. Крім цього, активація тирозинкінази приводить до збільшення фосфорилування залишків тирозину на внутрішній стороні рецептора, зміни його конформації та підвищення чутливості до інсуліну [231]. Завдяки цьому, можливо, підвищується здатність інсуліну посилювати транспорт глюкози у клітини. Крім того, наведені дані свідчать, що Хром підвищує зв'язування інсуліну на рецепторі плазматичної мембрани та опосередовану цим гормоном активацію клітинних процесів [218]. Таким чином, основна біологічна функція Хрому — це здатність підсилювати ефекти інсуліну, впливати на вуглеводний, ліпідний та білковий обмін і регуляцію метаболізму в цілому [222]. При цьому посилення дії інсуліну відбувається без зміни кількості самого гормону, воно цілком залежить від вмісту Хрому [232]. Ніяким іншим хромовмісним сполукам не притаманна здатність посилювати дію інсуліну таким чином. Дефіцит  $Cr^{3+}$  має місце при високому глікемічному індексі раціону, лактації, інфекціях та фізичних травмах тварин.

**1.3.3. Вплив сполук Хрому на оксидативний стрес.** Хром(III) необхідний для нормального функціонування протеїнового, ліпідного та вуглеводного обміну. Солі Cr(III) погано засвоюються у шлунково-кишковому тракті. Доведено значно більшу токсичність Cr(VI) порівняно з Cr(III). Зокрема у дослідженнях було встановлено, що в культивованих диплоїдних людських фібробластах сполуки Cr(VI) були в 1000 разів більш цитотоксичними і мутагенними, ніж сполуки Cr(III) [233,234]. Різниця у транспортуванні дво валентного Хрому через мембрани може полягати у їх відмінності індукувати утворення АФО і здатності стимулювати окисне пошкодження тканин. При оцінці дозозалежного впливу Cr(VI) на ген p53 у самок мишей лінії C57BL/6Ntac та у p53-дефіцитній лінії C57BL/6TSG посилювалася продукція АФО, ПОЛ та фрагментація ДНК у тканинах печінки та мозку [233]. Хром(VI) індукував більш виражене окиснювальне пошкодження у деяких органах-мішенях мишей p53-дефіцитної лінії. Дослідження показують, що каскад клітинних змін, включаючи оксидативний стрес, пошкодження геномної ДНК та модуляція регуляторного

гена p53, асоційованого з апоптозом, залучаються до індукованої Cr(VI) токсичності та канцерогенезу.

При порівнянні дії Cr(III) у сполуках з піколінатом і ніацином, було виявлено, що піколінат хрому спричиняв значно більший оксидативний стрес та пошкодження ДНК [233]. При дослідженні токсичності піколінату хрому виявлено порушення функцій нирок та печінки, анемію, гемоліз, набряк тканин, ураження клітин нейронів, порушення когнітивної, перцептивної та рухової активності, посилене виробництво гідроксильних радикалів, хромосомну аберацію, виснаження антиоксидантних ензимів та пошкодження ДНК. Було показано, що піколінат хрому є мутагенним [233]. У той же час хром, зв'язаний з ніацином є біодоступним та більш ефективним, і про його токсичність невідомо. Безпека Cr(III) в значній мірі залежить від ліганду, з яким він зв'язаний і лише клінічні дослідження можуть продемонструвати його безпеку та ефективність для людини.

Дослідниками було встановлено, що після 6-місячного комбінованого впливу добавок Хрому у вигляді хромовмісних дріжджів (1000 мкг) разом з вітамінами С (1000 мг) та Е (800 МО) у крові пацієнтів з діабетом другого типу значно знизилися рівні ТБК-активних продуктів, глюкози, HbA1c та резистентність до інсуліну, що свідчить про мінімізацію оксидативного стресу та поліпшення метаболізму глюкози у хворих на ЦД 2 типу [234].

Резистентність до інсуліну може з'являтися ще в перед діабетичному стані, тому саме в цей період слід застосовувати препарати для раннього лікування захворювання. У сучасних стратегіях лікування для зменшення інсулінорезистентності включають харчові добавки з вмістом Хрому [228].

Хром (VI) – токсикант, вплив якого пов'язаний з відновленням до станів нижчого окиснення. Хоча Cr(VI) відновлюється декількома шляхами, вважається, що його відновлення синтазою оксиду азоту (NOS) може мати значні наслідки для ендотеліальних клітин та клітин мозку. У дослідженнях було виявлено утворення стійких комплексів NOS з Cr(V) і Cr(VI) [235]. Утворення комплексу Cr(V) було незалежним від Кальцію і кальмодуліну, а відновлення Cr(VI) до Cr(V)

відбувалося в домені NOS, що містить флавін. Активація тетрагідробіоптерину (BH(4)) вільної NOS з кальцій/кальмодуліном знижує рівень Cr(V) у стаціонарному стані при одночасному збільшенні утворення супероксиду. Однак у присутності L-аргініну Cr(VI) не посилює вивільнення супероксиду, не інгібує утворення NO за активної NOS. Це говорить про те, що L-аргінін захищає BH(4) від окиснення, опосередкованого Cr(V). У той час, як Cr(V) був неактивним щодо NO. Cr(V) реагує із супероксидом за допомогою одноелектронного механізму передачі для отримання кисню та Cr(IV). Таким чином, відновлення Cr(VI) до Cr(V) NOS відбувається і в станах спокою, так і повністю активних. Цілковито ймовірно, що реакція між Cr(V) і супероксидом впливає на цитотоксичні механізми Cr(VI) у клітинах [235].

Хоча ефективне відновлення Cr(VI) до Cr(III) є загально визнаною причиною токсичності Cr(VI), зворотній процес (окиснення Cr(III) до Cr(VI)) тривалий час вважався несумісним з біологічними умовами [236]. Однак останні експериментальні дані показують, що таке окиснення може бути спричинене біологічними окиснювачами ( $H_2O_2$  або  $ClO^-$ ) або загальними ензиматичними системами (глюкозооксидазою або ксантинооксидазою у присутності відповідного субстрату та  $O_2$ ) при pH 7,4 та 37C [237].

Оксидативний стрес розглядають як дисбаланс між окиснювачами та антиоксидантами на користь попередніх, що потенційно може призвести до пошкодження клітин [238, 239]. Однією з головних причин хронічного оксидативного стресу у людини є змінений метаболізм глюкози, спричинений діабетом (як I, так і II типу) [240]. Перевантаження глюкозою призводить до утворення небажаного побічного продукту гліколізу гліцеральдегіду, який є сильним відновлювачем, швидко реагує з  $O_2$  та призводить до синтезу  $H_2O_2$ . У свою чергу, надлишок  $H_2O_2$  може спричинити окиснювальне пошкодження клітин підшлункової залози, що продукують інсулін (які мають відносно слабку антиоксидантну захисну здатність порівняно з іншими типами клітин), що призводить до загострення дисбалансу рівня глюкози [240]. Хронічний окиснювальний стрес вважається основною причиною поширених ускладнень



діабету, включаючи серцево-судинні захворювання, ретинопатію та ниркову недостатність [240], а також інших порушень інсуліну, таких як хвороба Альцгеймера [241].

У дослідженнях антиоксидантної дії Cr(III) [242] було виявлено, що ін'єкція мишам водного розчину CrCl<sub>3</sub> (5 мг кг<sup>-1</sup>) знижує токсичну дію CCl<sub>4</sub> (включаючи пероксидне окиснення ліпідів у печінці), яка, як вважають, пов'язана з утворенням сильних окисних радикалів CCl<sub>3</sub>. Додавання CrCl<sub>3</sub> (1–10 М, окремо або в поєднанні з 17-естрадіолом) до середовища культури клітин (моноцитів) значно знижувало рівень окиснення ліпідів і протеїнів у клітинах, оброблених H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, або з надмірною концентрацією глюкози [243]. Виявлена синергічна дія екстракту насіння винограду та Cr(III) пов'язаного з ніацином (2,2 мг кг<sup>-1</sup> протягом 10 тижнів) на зменшення шкідливого впливу дієт з високим вмістом жиру (включаючи високий вміст ПОЛ у плазмі крові) у сирійських хом'яків [244]. Також у дослідженнях на людях, хворих на діабет II типу, після прийому сполук Cr(III) було виявлено значне зниження рівня ПОЛ у плазмі крові [169, 245]. Зниження рівня ПОЛ у плазмі крові, спричинене додаванням Cr(III), було більш вираженим у гіперглікемічних пацієнтів з рівнем глюкози >8.5 mM, ніж у пацієнтів із слабкою гіперглікемією (7,3–8,4 mM), тоді як значне збільшення ПОЛ спостерігалось у еуглікемічних (не-діабетиків) суб'єктів (рівень глюкози = 4,7–5,3 mM) [245].

Подвійну дію Cr (III) як антиоксиданту або прооксиданту можна пояснити на основі окиснювально-відновних реакцій. Реакції комплексів Cr(III) з пероксидами ліпідів (ROOH), ймовірно, відповідають за здатність цих сполук знижувати рівень ПОЛ [169,242-245], але ці реакції виробляють інші сильні окиснювачі, такі як Cr(V). Саме вони, а також пероксильні (ROO •) радикали, утворені в реакціях окиснювально-відновних циклів певних сполук Cr(III), ймовірно, є причиною збільшення маркерів окисного стресу, спричинених введенням Cr(III) [246-248]. Таким чином, комплекси Cr(III), що використовуються як харчові добавки, беруть участь у делікатному балансі між реакціями окиснення та відновлення в плазмі крові, що найбільш наочно показано

зміною м'якого антиоксидантного ефекту від тривалого лікування Cr(III) у пацієнтів з діабетом II типу та м'якого прооксидантного ефекту того ж протоколу лікування у здорових осіб [245].

**1.3.4. Дія сполук Хрому на метаболізм у людей із цукровим діабетом і без нього.** Додавання Cr(III) не спричиняє значущих поліпшень метаболічних параметрів, пов'язаних з інсуліном, не сприяє втраті ваги або зростанню ваги тіла у недіабетичних осіб; однак тривале лікування високими дозами Cr(III) (наприклад,  $\geq 200$  мкг Cr / добу протягом 2 місяців) поліпшує глюкозотолерантність у багатьох пацієнтів із типом II діабету [249-251]. Ефективність дії сполук Cr(III) сильно відрізняється між окремими людьми, що залежить від наявності або відсутності діабетичного стану, а також від інших ще невизначених факторів [251, 252]. Дослідниками проілюстровано можливий механізм дії харчових добавок, що містять Cr(III) (включаючи широко використовуваний  $\text{Cr}(\text{pic})_3$  та запропоновану альтернативу  $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{OCOEt})_6(\text{OH})_3]^+$ ) [251, 253]. Харчові добавки Cr(III) всмоктуються в тонкому кишечнику і частково з'єднуються з протеїнами сироватки крові - альбуміном та трансферіном [254,255]. Крім того, стійкий хелатний комплекс  $\text{Cr}(\text{pic})_3$  може метаболізуватися печінковими ензимами з вивільненням більш реакційноздатних видів Cr(III) [256]. Як початкові сполуки Cr(III), так і продукти їх метаболізму (включаючи Cr(III)-протеїнові комплекси) можуть бути окиснені до Cr(VI) ( $[\text{CrO}_4]_2^-$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ClO}^-$  або ензиматичними системами в біологічних рідинах [257, 258]. Це окиснення, швидше за все, відбувається переважно позаклітинно, оскільки клітинне поглинання сполук Cr(III) відбувається дуже повільно [233], а концентрації сильних окиснювачів менш жорстко контролюється у позаклітинних рідинах порівняно з внутрішньоклітинним середовищем. Отримані  $[\text{CrO}_4]_2^-$  легко перетинають клітинні мембрани через аніонні канали та відновлюються до Cr(III) внутрішньоклітинними редуктантами з утворенням високореактивних проміжних Cr (V/IV) та органічних радикалів [233]. Ці проміжні продукти, як і сам Cr(VI), можуть окиснювати залишки Суs фосфотирозинфосфатази та інших регуляторних

ензимів, викликаючи зміни в клітинній сигналізації, включаючи посилення сигналів інсуліну через фосфорилування тирозину в  $\beta$ -субодиницях рецепторів інсуліну [259]. Проміжні сполуки Cr(V/IV) (або їх більш стійкі комплекси з клітинними лігандами, такими як вуглеводи) [256] також можуть бути відповідальними за окиснювальне пошкодження ДНК та протеїнів, які можуть призвести до експресії гена канцерогенних порушень [260]. Також Cr(V/IV) види можуть утворюватися під час реокиснення комплексів Cr(III), що накопичуються всередині клітин [261].

Дія різних сполук Cr(III) як активаторів інсуліну корелює з їх реактивністю до біологічних окиснювачів [257]. Наприклад, хром пропіонат ( $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{OCOEt})_6(\text{OH}_2)_3]^+$ ), який є відносно стійким до гідролізу в нейтральних водних розчинах (на відміну від  $\text{CrCl}_3$ ) і легко окислюється до Cr(VI) (на відміну від  $\text{Cr}(\text{pic})_3$ ) [257] демонструє найвищу активність, збільшуючи рівень інсуліну у тварин [262,263]. Як правило, вища активність сполук Cr(III) у хворих на діабет у порівнянні з недіабетиками [252] може корелювати з поширеністю оксидативного стресу при діабеті [240], що призводить до виснаження антиоксидантів у плазмі крові та полегшує позаклітинне окиснення Cr(III) до Cr(VI). Антидіабетична активність Cr(III) та канцерогенність Cr(VI) вимагають розв'язання проблеми, пов'язаної з безпекою використання Cr(III) як харчових добавок або терапевтичних засобів для людей з діабетом.

Фосфорилування та дефосфорилування залишків тирозину протеїнтирозинкіназ та фосфотирозинпротеїназ відповідно, є визначальними у багатьох сигнальних шляхах клітин, включаючи сигналізацію інсуліну [264-266]. Тому здатність сполук Cr(III) впливати на фосфорилування тирозину вважається вірогідною причиною їх протидіабетичної активності [267].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Об'єкт та умови дослідження

Дослідження за темою дисертаційної роботи проводились впродовж 2014–2019 роках відповідно до планів науково-дослідних робіт лабораторії біохімії, адаптації та онтогенезу тварин (акредитація №021/біол.) Інституту біології тварин НААН України. Дослідження проводили на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою 150-170 г, яких утримували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН України, за відповідною температурного режиму (20-25°C), вологості (40-45 %) та освітлення з дотриманням етичних норм проведення експериментів на тваринах згідно з “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями “Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовують в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1985) та протоколом комісії з біоетики Інституту біології тварин (№75 від 23.10.2018). Всі дослідні тварини мали вільний доступ до комбікорму (з розрахунку добової потреби) та води (з розрахунку 20 мл води на одного щура на добу). Кількість спожитого стандартного комбікорму для лабораторних тварин визначали за його залишком у годівниці. Контроль за ростом і розвитком тварин проводили шляхом зважування їх на початку та в кінці дослідів.

#### 2.2. Схема досліджень.

Відповідно до поставлених завдань дисертаційної роботи експериментальна частина включала три серії досліджень (рис. 2.1).

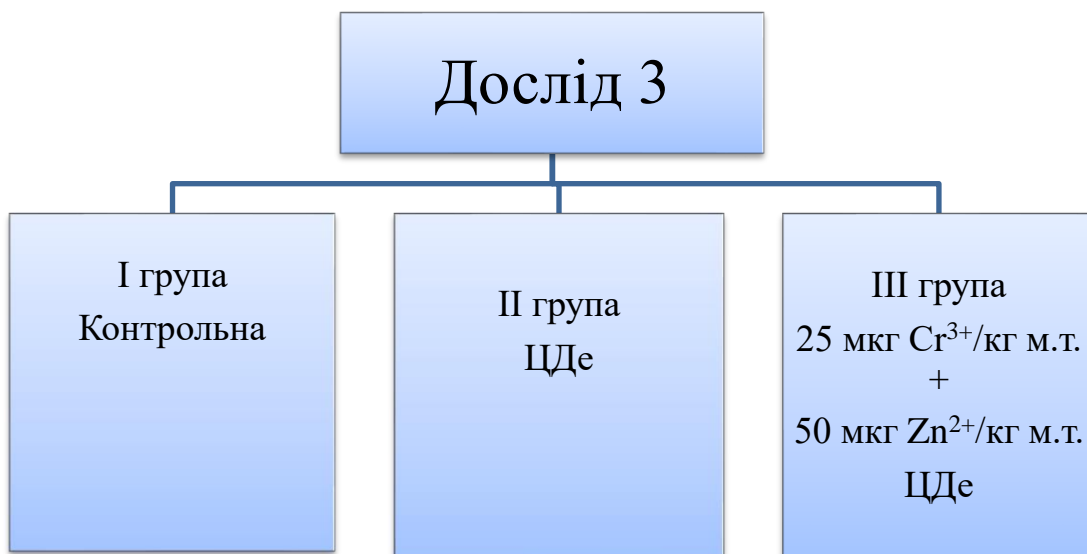
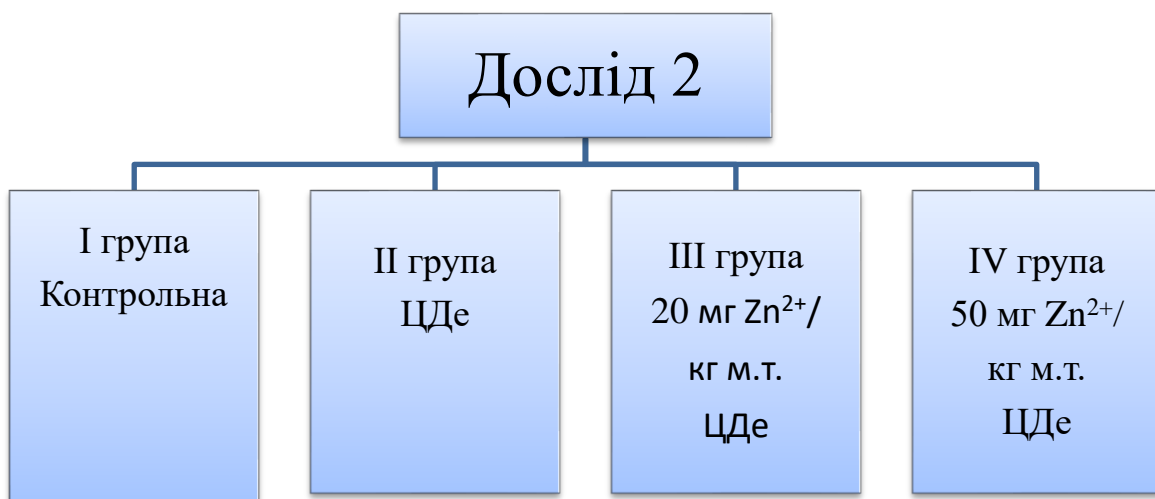
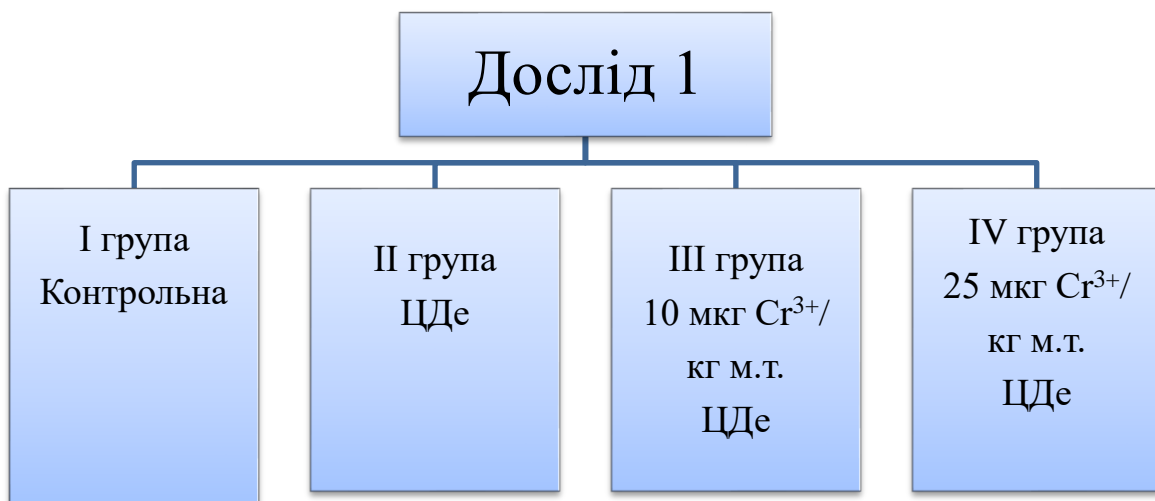


Рис. 2.1. Схема експериментальних досліджень.

Метою першої та другої серії досліджень було з'ясування оптимальної дози цитрату хрому і цитрату цинку, які б проявляли позитивний вплив на досліджувані ланки метаболічних процесів за умов експериментального цукрового діабету. У цих серіях щури були розділені на чотири групи (I – контрольна, II, III і IV – дослідні), по 7 тварин у кожній групі. Тварини у групах були однакового віку та маси тіла (130-150 г). Протягом чотирьох тижнів до основного раціону тварин III і IV дослідних груп у першій серії досліджень із водою додавали цитрат хрому у дозах 10 і 25 мкг  $\text{Cr}^{3+}$ /кг маси тіла, а у другій серії – цитрат цинку у дозах 20 і 50 мкг  $\text{Zn}^{2+}$ /кг маси тіла відповідно.

У третій серії досліджень, тваринам III групи із водою сумісно додавали цитрат хрому у дозі 25 мкг  $\text{Cr}^{3+}$ /кг м.т і цитрат цинку – 50 мкг  $\text{Zn}^{2+}$ /кг маси тіла.

З метою індукції експериментального цукрового діабету (ЦДЕ) тваринам усіх дослідних груп першої, другої і третьої серії досліджень на тлі 24-годинного голодування на 30 добу з моменту постановки досліду, одноразово внутрішньочеревинно вводили розчин стрептозотоцину (“Sigma”, США), з розрахунку 65 мг/кг, який розводили цитратним буфером (рН 4,5) з попереднім (за 15 хв) інтраперитонеальним уведенням нікотинамідом у дозі 230 мг/кг [268,269]. Щурам контрольної групи вводили аналогічний об'єм розчинника (цитратний буфер з рН 4,5). Виникнення гіперглікемії спостерігали вже з 3 доби після введення стрептозотоцину. Тривалість досліджень ЦДЕ становила 10 діб, з моменту введення діабетогенної речовини. Для підтвердження гіперглікемії проводилося щодобове вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра (“Gamma-M”). Для експерименту використовували тварин з концентрацією глюкози від 14 ммоль/л.

Забій тварин для проведення біохімічних досліджень, проводили на 40 день досліджень шляхом декапітації за легкого тіопенталового наркозу.

Вивчення активності ензимів і субстратів вуглеводного обміну, продуктів пероксидного окиснення ліпідів, ензимів антиоксидантної системи проводили в клітинах крові та тканинах скелетних м'язів, печінки і підшлункової залози, як таких, що беруть участь у процесах нагромадження та утилізації глюкози.

## **2.3. Сполуки, які використовували у дослідженнях**

### **2.3.1. Стрептозотоцин.**

Стрептозотоцин – антибіотик, що проявляє цитотоксичну дію, зумовлює селективне руйнування  $\beta$ -клітин острівців Лангергарса підшлункової залози, що в кінцевому підсумку призводить до їх некротичної загибелі [270].

Стрептозотоцин - це порошок жовтувато-білого кольору, який зберігається у стерильному посуді. Стрептозотоцин попереджує синтез ДНК у бактеріальних клітинах та клітинах ссавців. У бактеріальних клітинах він вступає у реакцію з цитозиновими групами, результатом якої є дегенерація та деструкція ДНК. Результатом цього біохімічного механізму є клітинна смерть. Стрептозотоцин викликає діабет майже у всіх біологічних видів. Діабетогенна доза варіює, оптимальна доза для щурів – 50-70 мг/кг, мишей – 175-200 мг/кг, собак – 15 мг/кг упродовж трьох днів. Стрептозотоцин, розчинений у стерильному цитратному буфері 0,1 М (рН 4,5-4,8), уводиться внутрішньоочеревинно або внутрішньовенно [271, 272]. Цікавою особливістю цієї моделі є те, що значна гіперглікемія (верифікується уже через 3-5 днів після уведення стрептозотоцину шляхом забору крові з хвостової вени) розвивається без істотного зменшення маси тіла.

Однак, для відтворення ЦД 2 типу, за даними літературних джерел, є превентивне уведення нікотинаміду безпосередньо перед інтоксикацією стрептозотоцином, яке мінімізує ушкоджувальний вплив цитотоксину, і, ймовірно, виявляє цитопротективний вплив на острівці Лангерганса підшлункової залози [271-273]. Так об'єктивно фіксується розвиток помірної гіперглікемії і відбувається зменшення кількості інсуліну на 40 %, а також стабілізація інших клінічних проявів ЦД 2 типу. За даними дослідників [272] уведення нікотинаміду перед стрептозотоцином найбільш повно відповідає моделі ЦД типу-2, що проявляється помірною і стабільною гіперглікемією, наявністю глюкози в сечі, без явищ ацидозу.

**2.3.2. Цитрати цинку і хрому.** Цитрат хрому і цитрат цинку – органічні сполуки, які перспективні щодо збагачення харчових продуктів для людей і кормів для тварин. Як альтернативу хімічним методам синтезу сполук металів з органічними кислотами їх отримано за допомогою методу нанотехнології [274,275]. Цей спосіб є більш дешевий, дозволяє вийти на промислові обсяги виробництва та створити сполуки біометалів високої чистоти.

Синтез цитратів хрому і цинку за нанотехнологією відбувається в два етапи. На першому етапі отримують водний колоїдний розчин наночастинок Хрому і Цинку диспергуванням високочистих гранул відповідних металів імпульсами електричного струму в деіонізованій воді. На другому етапі отримують власне карбоксилати біогенних металів за реакцією прямої взаємодії хімічно активних наночастинок з лимонною кислотою. Оскільки до числа реагентів не входять жодні інші речовини, а наночастинок повністю беруть участь в хімічній реакції синтезу солі лимонної кислоти, у результаті утворюється сполука високої хімічної чистоти, яка не містить наночастинок [275]. Збагачення ж харчових продуктів мікроелементами, зокрема Хромом і Цинком, у вигляді зв'язаних сполук – карбоксилатів лимонної кислоти, а не вільних наночастинок Хрому, знімає одну важливу і, на нашу думку, цілком обґрунтовану проблему ризику використання в продуктах харчування високо реакційноздатних і мало контрольованих наночастинок, властивості яких постійно змінюються з часом і зміною середовища.

**2.4. Отримання лізатів еритроцитів та гомогенатів досліджуваних тканин.** Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугуванням при 1000 g протягом 15 хв. Плазму відбирали і використовували для подальших досліджень. Еритроцити тричі промивали охолодженим фізіологічним розчином (0,9 % розчин NaCl) при 1000 g по 15 хв. Відмиті еритроцити гемолізували дистильованою водою, додаючи до 1 мл еритроцитарної маси 10 мл дистильованої води. Суміш збовтували протягом 10 хв і центрифугували при 1000 g для видалення стром еритроцитів. Відбирали супернатант, який використовували для подальших досліджень [276].



Тканини печінки, скелетних м'язів та підшлункової залози, одержували через 1-2 хв після забою тварин. Тканини зберігали протягом 5-6 хв на льоді, потім їх обезкровлювали багаторазовою перфузією охолодженим фізіологічним розчином за допомогою голки і шприца та дрібчасто подрібнювали ножницями.

Подрібнену тканину зважували (наважка 1 г) та поміщали у скляний гомогенізатор з тефлоновим пестиком (МРТУ – 421505-63). Для попередження нагрівання під час гомогенізації посудину гомогенізатора поміщали у мішечок з кусочками льоду. Гомогенізацію тканини проводили впродовж 30-50 с, роблячи декілька рухів посудиною вгору і вниз; швидкість обертання пестика становила 200-300 г. Середовищем для гомогенізації був охолоджений 5 мМ трис-НСІ буфер рН 7,4, при чому кінцеве розведення гомогенату становило 1:9.

Отриманий тканинний гомогенат фільтрували через 2 шари марлі в пробірку для центрифугування. Для одержання цільної фракції і видалення не повністю зруйнованих клітин і ядер гомогенат центрифугували 10 хв при 1000g ( $t=0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Для досліджень використовували надосадову рідину [277].

## **2.5. Визначення активності ензимів та метаболітів вуглеводного обміну.**

*Визначення концентрації глюкози в плазмі крові* [278]. Концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом за допомогою аналітичного набору для ензиматичного визначення глюкози в сироватці і плазмі крові «ХРОМГЛЮКОЗА+» (Україна). Принцип методу: при окисненні глюкози глюкозооксидазою утворюється  $\text{H}_2\text{O}_2$ , який у присутності пероксидази окиснює о-діанізидин, перетворюючи його у сполуку, забарвлену в синій колір.

Інтенсивність забарвлення визначали фотометричне при 530 нм. Кількість глюкози вираховували за формулою:

$$C = (E / E_k) \times 10, \text{ де} \quad (2.1)$$

C – вміст глюкози в дослідній пробі, ммоль/л;

E і  $E_k$  – оптичні густини дослідної та калібрувальної проб відповідно;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л.

**Визначення концентрації загального гемоглобіну** [279]. Визначення концентрації загального гемоглобіну (Hb) проводили гемоглобінціанідним методом з використанням стандартного набору реактивів «Філісіт- Діагностика» (Україна). Принцип методу полягає в тому, що відбувається взаємодія гемоглобіну з червоною кров'яною сіллю, після чого він перетворюється в метгемоглобін. Метгемоглобін реагує з ацетонціангідрином, в результаті чого утворюється забарвлений продукт – гемоглобінціанід. Інтенсивність його забарвлення залежить від концентрації гемоглобіну в досліджуваній крові. Вміст гемоглобіну виражали в г/л.

**Визначення рівня глікозильованого гемоглобіну** [280]. Визначення рівня глікозильованого гемоглобіну проводили хроматографічним методом за допомогою тест-систем на аналізаторі D10 Hemoglobin Testing System Bio-Rad для визначення глікозильованого гемоглобіну (виробник Bio-Rad laboratories ins, Hercules, CA, USA; 2006 р). Принцип методу ґрунтується на кислотному гідролізі кетоамінного зв'язку в присутності щавелевооцтової кислоти. У результаті реакції утворюється 5-оксиметилфурфурол, який, взаємодіючи з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворює забарвлений комплекс, інтенсивність якого визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 443 нм. Одиниці виміру – відсотки (%).

**Визначення активності ензимів обміну вуглеводів.** В лізатах еритроцитів, а також у гомогенатах тканин печінки, підшлункової залози і скелетних м'язів визначали активність ензимів обміну вуглеводів: лактатдегідрогеназу (КФ 1.1.1.27) [281] і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (КФ 1.1.1.49) [282].

Активність ензимів визначали за допомогою спектрофотометричних методів, які базуються на використанні спряжених систем окиснення або відновлення нікотинамідних коензимів. Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі 1205 Vis (USA) при  $t + 37^{\circ}\text{C}$ . Поглинання при 340 нм вимірювали в інтервалі 3 хв. Використовували мілімолярний коефіцієнт екстинкції NADH і NADPH ( $6,22 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  при 340 нм). Визначення активності

ензимів проводили в 0,05 М трис-НСl буфері, який містив  $5 \times 10^{-4}$  М EDTA, рН 7,5. Загальний об'єм реакційної суміші становив 3 мл.

Концентрації компонентів субстратних сумішей становили:

- для лактатдегідрогенази:  $1 \times 10^{-3}$  М пірувату натрію,  $5 \times 10^{-5}$  М NADH,  $3 \times 10^{-3}$  М MgCl<sub>2</sub>;

- для глюкозо-6-фосфатдегідрогенази:  $1 \times 10^{-3}$  М глюкозо-6-фосфату (Reanal),  $5 \times 10^{-3}$  М MgCl<sub>2</sub>;  $0,5 \times 10^{-4}$  М NADP ("Acros Organics", Бельгія).

Активність ензимів розраховували за формулою:

$$A = \frac{E \times V}{6,22 \times c}, \text{ де} \quad (2.2)$$

E – зміна оптичної густини за 1 хв;

V – об'єм реакційної суміші;

c – кількість протеїну;

6,22 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції нікотинамідних коензимів ( $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

**Визначення концентрації L- лактату** [283]. Принцип методу: ензиматичне окиснення L-лактату поєднане із неензиматичною реакцією між фероціанідом  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , генерованим внаслідок ензиматичної реакції, та іонами Феруму(III). Внаслідок цих взаємодій утворюється інтенсивно забарвлений продукт – берлінська блакить. В якості ензиму використовували L-лактат: фероцитохром с-оксидоредуктази, яка каталізує необоротне окиснення L-лактату до пірувату. Цей ензим є високоселективним до L-лактату і є термостабільним протеїном, оскільки походить із клітин термотолерантних метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha*. Реакційна суміш для проведення колориметричного аналізу складається з 25 мМ фосфатного буфера, рН 7,7, та наступних інгредієнтів з кінцевою концентрацією: 3мМ фероціанід калію ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ); 20 мМ хлорид феруму (III) в 30 мМ HCl; 0,5 М щавлева кислота; 0,023 од./мл. активності флавоцитохрому b<sub>2</sub> (ФЦb<sub>2</sub>).

Хід аналізу: для аналізу відбирали 0,68 мл 25 мМ фосфатного буфера, рН 7,7; 0,1 мл 30 мМ  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  та 0,02 мл ФЦ b<sub>2</sub> (з об'ємною активністю 1,1 од./мл).

Запускали реакцію додаванням 0,2 мл досліджуваного зразка. Реакцію проводили в затемненому місці протягом 30 хв при температурі 25°C.

Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням реагенту 0,3мл 200 мМ FeCl<sub>3</sub> в 30 мМ HCl, який водночас призводить до утворення кінцевого кольорового продукту – берлінської блакиті. Для його солубілізації вносили 1,7 мл 0,9М щавлевої кислоти. Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводили на спектрофотометрі 1205 Vis в кюветі на 3 мл (оптичний шлях 1 см), при 525 нм проти "сліпої" пробки (додавались усі компоненти, крім дослідного зразка і 0,2 мл дистильованої води). Концентрацію L-лактату у досліджуваних зразках визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі модельних водних розчинів L-лактату із відомою концентрацією.

**Визначення концентрації пірувату [284].** Принцип методу базується на реакції перетворення пірувату в лактат, під дією лактатдегідрогенази. Реакція практично незворотня, а рівновага реакції різко зміщена вправо. Реакція протікає стехіометрично, тому окиснення 1 моля НАДН відповідає відновленню 1 моля пірувату. Реактиви: тріс-HCl буфер 0,3 М розчин, рН, 7,5; NADH 0,005 М розчин; лактатдегідрогеназа.

Хід визначення. У кювету вносять всі реактиви, окрім ензиму, і досліджуваний екстракт. Доводять об'єм бідистильованою водою до 3 мл, перемішують і через 3 хв фіксують показник спектрофотометра (E<sub>1</sub>). Реакцію починають додаванням лактатдегідрогенази. Після закінчення реакції через 5 хв фіксують показник приладу (E<sub>2</sub>). Вміст пірвиноградної кислоти в пробі вираховують за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times k}{6,22}, \text{ де} \quad (2.3)$$

$\Delta E = (E_1 - E_2)$  — зміна оптичної щільності;

K — коефіцієнт розведення відносно до тканини (г);

6,22 — коефіцієнт мілімолярної екстинкції NADH при довжині хвилі 340 нм у кюветі шириною 1 см.

**2.6. Визначення концентрації загального протеїну [285].** Концентрацію загального протеїну визначали за методом Лоурі, принцип якого полягає в утворенні кольорових продуктів взаємодії ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна-Чекальтеу у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки протеїну.

Значення концентрації протеїну знаходили за калібрувальним графіком, в якості контролю використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA, "Sigma", США). Результат виражали у мг протеїну на мл зразка.

### **2.7. Визначення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів.**

*Гідропероксиди ліпідів [286].* Принцип методу полягає у визначення вмісту гідропероксидів ліпідів у біологічному матеріалі шляхом осадження протеїнів розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) та екстракцією ліпідів етанолом з наступною взаємодією досліджуваних екстрактів з тіоціанатом амонію.

Підготовку проб для екстрагування проводили при  $t < 4$  °С. 0,2 мл біологічного матеріалу поміщали в центрифужну пробірку, додавали 2,8 мл етанолу і 0,05 мл 50 % розчину ТХО. Пробірку закривали і струшували протягом 5–6 хв. Утворений протеїновий осад виділяли центрифугуванням протягом 10 хв при 1000 g.

Одержаний супернатант, який являє собою етанольний екстракт ліпідів, використовували як об'єкт для визначення гідропероксидів ліпідів. Визначення гідропероксидів ліпідів: до 1,5 мл етанольного екстракту додавали 1,2 мл етанолу, 0,02 мл концентрованої HCl та 0,03 мл 1 % розчину солі Мора в 3 % розчині HCl. Суміш струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20 % розчину тіоціанату амонію. Вимірювання оптичної густини проводили через 10 хв після додавання тіоціанату амонію на спектрофотометрі при довжині хвилі 480 нм. У контрольну пробу замість біологічного матеріалу вносили 0,2 мл бідистильованої води.

Вміст гідропероксидів ліпідів у біологічному матеріалі розраховували за формулою:

$$D_{480}(\text{дослід}) - D_{480}(\text{контроль}) = \Delta D_{480} \text{ (гідропероксидів ліпідів)} \quad (2.4)$$

Отримані результати виражали у показниках різниці оптичної густини досліджуваного зразка при  $\lambda=480$  нм з розрахунку на 1 мл плазми крові ( $\Delta D_{480}/\text{мл}$ ) або на 1 г гомогенату тканини ( $\Delta D_{480}/\text{г}$ ).

**ТБК-активні продукти** [287] Принцип методу полягає в тому, що в біологічному матеріалі індукуються процеси пероксидації ліпідів, а швидкість їх перебігу ідентифікують шляхом визначення вмісту нагромадженого малонового діальдегіду. В основі цього визначення лежить реакція між малоновим діальдегідом та тіобарбітуровою кислотою, яка за  $t=100^{\circ}\text{C}$  і кислого середовища протікає з утворенням кольорового комплексу, що містить одну молекулу малонового діальдегіду та дві молекули тіобарбітурової кислоти.

Вміст малонового діальдегіду у пробі визначали колориметричним методом на спектрофотометрі 1205 Vis при довжині хвилі  $\lambda=535$  нм та  $\lambda=580$  нм. У розрахунках використовували коефіцієнт молярної екстинції  $0,156 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові виражали у мкмоль МДА/мл, у гомогенатах тканин – мкмоль МДА/г.

## 2.8. Визначення показників системи антиоксидантного захисту.

**Супероксиддисмутазна активність** (СОД; КФ 1.15.1.1) [288]. Принцип методу полягає у відновленні нітросинього тетразолію супероксидними радикалами, які утворюються в реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинамідаденіндинуклеотиду. Утворення продукту відновлення нітросинього тетразолію – нітроформазону – блокується супероксиддисмутазою.

Екстинцію вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі  $\lambda=540$  нм.

Активність ензиму визначали за формулою:

$$A = \frac{E_{\text{к.пр}} - E_{\text{д.пр}}}{E_{\text{к.пр}}} \times 100\%, \quad (2.4)$$

де  $A$  – ступінь блокування нітроформазону;

$E_{\text{к.пр}}$  – екстинція контрольної проби, од. екст.;

$E_{д.пр.}$  – екстинція дослідної проби, од. екст.

Супероксиддисмутазну активність виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну ( 1 ум. од. = 50% блокування).

**Каталазна активність** (КАТ КФ 1.11.1.6) [289]. Принцип методу базується на здатності пероксиду гідрогену утворювати з солями молібдату стійкий кольоровий комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі 1205 Vis при довжині хвилі  $\lambda=410$  нм проти контрольної проби, у яку замість пероксиду гідрогену вносили воду.

Каталазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{(E_x - E_d)}{K \times V \times t} \quad (2.5)$$

де,  $A$  – каталазна активність, мкмоль  $H_2O_2$ /хв  $\times$  мг протеїну;

$E_x$  – екстинція холостої проби, у якій дослідну тканину заміняють водою, од.екс.;

$E_d$  – екстинція дослідної проби, од.екс.;

$K$  – коефіцієнт молярної екстинції пероксиду гідрогену, що становив  $22,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;

$V$  – об'єм проби, мл;

$t$  – час інкубації, с.

**Глутатіонпероксидазна активність** (ГП, КФ 1.11.1.9) [290]. Мірою глутатіонпероксидазної активності є швидкість окиснення глутатіону у присутності гідропероксиду третичного бутилу. Концентрацію відновленого глутатіону до і після інкубації визначають колориметрично при довжині хвилі  $\lambda=412$  нм. В основі кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з 5,5-дитіобіс (2-нітробензойною) кислотою з утворенням кольорового продукту тіонітрофенільного аніону. Кількість тіонітрофенільного аніону прямо пропорційна кількості SH-груп, які прореагували з 5,5-дитіобіс (2-нітробензойною) кислотою.

Глутатіонпероксидазну активність визначали за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times P}{E_{ст} \times t \times V \times C}, \quad (2.6)$$

де,  $\Delta E$  – різниця екстинкцій контрольної та дослідної проб;

$P$  – розведення;

$V$  – об'єм дослідного зразка в кюветі, мл;

$E_{ст}$  – екстинкція стандартної проби;

$C$  – концентрація протеїну, мг/мл;

$t$  – час реакції (5 хв).

Отримані результати виражали в нмоль/ хв  $\times$  мг протеїну.

**Глутатіонредуктазна активність** (ГР, КФ 1.8.1.7) [291]. Активність глутатіонредуктази визначали спектрофотометрично за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH (NADH). Реактиви: 0,05 М фосфатний буфер, рН 8,0; 1 мМ ЕДТА; 7,5 мМ окиснений глутатіон; 1,2 мМ NADH чи NADPH.

Хід визначення: Активність ГР визначали у реакційному середовищі, яке містить 2 мл фосфатного буфера, 0,2 мл ЕДТА, 0,5 мл окисненого глутатіону, 0,2 мл дослідного зразку, 0,1 мл NADH. Активність ензиму визначають за зниженням вмісту NADH при 37<sup>0</sup>С протягом 10 хв на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.

Активність ГР визначали за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times V}{\varepsilon \times C \times t \times \alpha \times l}, \text{ де} \quad (2.7)$$

$\Delta E$  – різниця екстинкції за час реакції;

$V$  – об'єм інкубаційного середовища, мл;

$\varepsilon$  – молярний коефіцієнт екстинкції для NADPH, що дорівнює  $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;

$t$  – час реакції, хв;

$C$  – концентрація протеїну, мг/мл;

$\alpha$  – об'єм лізату, який вносили у кювету;

$l$  – довжина оптичного шляху.

Активність ГР виражали в мкмоль NADPH/хв  $\times$  мг протеїну.

**Визначення вмісту відновленого глутатіону** [292]. Вміст відновленого глутатіону визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті



взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою при довжині хвилі 412 нм. Реактиви: осаджуючий реактив (льодяна метафосфорна кислота – 6,68 г; трилон Б – 0,80 г; хлористий натрій – 120,0 г; дистильована вода до 400 мл); 0,3 М розчин  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  у дистильованій воді; реактив Елмана (0,04 % розчин 5,5-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти в 1 % розчині 3-заміщеного цитрату натрію).

I етап. Дослідна проба: гемолізат еритроцитів (1:10), або гомогенат тканини – 2 мл, осаджуючий реактив – 3 мл; контрольна проба: осаджуючий реактив – 3 мл, дистильована вода – 2 мл. 5 хвилин витримували при кімнатній температурі. Надалі центрифугували при 1000 g, після чого відфільтровували надосадову рідину (отримували безпротейіновий фільтрат-центрифугат).

II етап. Дослідна проба: центрифугат – 2 мл, 0,3 М розчин  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 8 мл, реактив Елмана – 0,1 мл; контрольна проба – 0,3 М розчин  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 8 мл, реактив Елмана – 0,1 мл. Через 5 хвилин спектрофотометрували дослідну пробу проти контрольної при довжині хвилі 412 нм. Розрахунок кількості GS-H в еритроцитах в ммоль/л (або на г, якщо тканина) здійснювали за допомогою калібрувальної кривої.

## **2.9.Визначення NO-синтазної активності [293]**

*Загальна NO-синтазна активність* (NOS, КФ 1.14.13.19). Сумарну NO-синтазну активність визначали за методикою, яка полягає в тому, що в ході реакції, яка каталізується NOS з L-аргініну у присутності молекулярного кисню, утворюється NO і L-цитрулін та відбувається стехіометричне окиснення NADPH. Зменшення кількості NADPH, який еквімолярний кількості утвореного NO, реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Активність NOS визначали в реакційній суміші наступного складу: 2,5 мл 0,1 М трис-НСІ буферу (рН 7,4), який містив 10 мМ  $\text{CaCl}_2$  та 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,3 мл водного розчину 200 мкМ L-аргініну (кінцева концентрація в пробі 20 мкМ); 0,1 мл водного розчину 1 мМ NADPH.

Реакцію запускали внесенням 0,1 мл лізату досліджуваних клітин. Контрольна проба готувалась аналогічно до дослідної, але без додавання NADPH. Безсубстратне окиснення NADPH досліджували в реакційній суміші, що містила 0,3 мл води замість розчину аргініну.

Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних при 340 нм, потім інкубували 20 хв при 37°C, зупиняли реакцію внесенням 0,02 мл 0,02 %  $\text{NaN}_3$  і реєстрували зниження екстинкції.

Для підвищення специфічності вирахування ступінь окиснення NADPH, пов'язаного лише з активністю NOS, використовували додаткову пробу, яка замість L-аргініну містила 0,3 мл водного розчину неспецифічного інгібітора NOS – L-NAME у аналогічній до субстрату концентрації. Різниця між ступенем окиснення NADPH з L-аргініном і з інгібітором дає ступінь окиснення NADPH, залежну від конкурентного неселективного інгібітора всіх ізоформ NOS, тобто активність NOS.

Активність NOS (в пмоль NADPH/хв·×мг протеїну) розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot a}{\varepsilon \cdot V_1 \cdot c \cdot t \cdot l}, \quad (2.8)$$

де,  $\Delta E$  – різниця екстинкцій до і після інкубації;

$V$  – об'єм інкубаційної суміші, мл;

$a$  – розведення вихідного зразка;

$\varepsilon$  – мілімолярний коефіцієнт екстинкції ( $6,23 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ );

$V_1$  – об'єм лізату;

$c$  – концентрація протеїну, мг/мл;

$t$  – час проходження реакції, хв;

$l$  – довжина оптичного шляху, см.

**Окремі ізоформи NO-синтазної активності** [294]. Методика визначення активності індукбельної NO-синтази (iNOS) аналогічна попередній за деякими відмінностями: для визначення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість  $\text{CaCl}_2$  додавали 2 мкмоль ЕДТА. Активність конститутивної NO-

синтази (cNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS.

## **2.10. Імуноензимний метод визначення вмісту інсуліну та С-пептиду**

Вміст інсуліну та С-пептиду у плазмі крові щурів визначали імуноензимним методом застосовуючи стандартні набори ELISA згідно інструкцій фірм-виробників DRG.

**Інсулін** визначали ензимзв'язаним імуносорбентним аналізом, який базується на принципі «сендвіча». Мікро планшетні комірки покриті моноклоальним антитілом, яке здатне реагувати з антигеном, тобто інсуліном. Аліквоти сироватки зразка біоматеріалу, який містив ендогени інсуліну, інкубували в комірках, які містили ензимний кон'югант (виступає в якості анти-інсулін антитіла, що кон'юговане біотином).

Після інкубації ензимний комплекс кон'югований з пероксидазою хрому (horse radish peroxidase, HRP), зв'язується з біотинильованим анти-інсуліновим антитілом. Кількість зв'язаного HRP комплексу пропорційна кількості інсуліну у зразку біоматеріалу. Після додавання розчину субстрату розвивається яскраве забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації інсуліну у досліджуваному зразку.

**С-пептид** визначали використовуючи принцип конкурентного зв'язку. Дно лунок мікро-планшету покритий анти-мишачими антитілами, які зв'язують моноклоальне антитіло, яке здатне взаємодіяти з С-пептидом. Ендогенний С-пептид досліджуваного зразку конкурує з С-пептидом кон'югованим з пероксидазою хрому за зв'язування з первинним антитілом. Після інкубації вимивається незв'язаний кон'югат. Кількість зв'язаного кон'югату обернено пропорційна концентрації С-пептиду в зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації С-пептиду у досліджуваному зразку.

## 2.11. Визначення вмісту мікроелементів Хрому і Цинку.

Визначення вмісту мікроелементів здійснювали атомноабсорбційним методом. Принцип методу полягає у тому, що зразок розпилюється у полум'ї, де утворюється холодна атомна пара. Через атомну пару проходять промені світла певної резонансної частоти відповідного елемента, де електронами зовнішньої оболонки поглинається частина світлового потоку, подальша інтенсивність якого визначається детектором. Поглинання пропорційне концентрації елемента у полум'ї. Порівняно з калібрувальною кривою за допомогою комп'ютерної програми здійснюється перерахунок концентрації елемента у пробі.

Концентрацію елементів розраховують за формулою:

$$C_{\text{п}} = \frac{C_{\text{р}} V K}{m \text{ або } V_1}, \text{ де:} \quad (2.9)$$

$C_{\text{п}}$  — концентрація елемента у пробі;

$C_{\text{р}}$  — концентрація елемента у розчині;

$V$  — вихідний об'єм досліджуваного розчину;

$K$  — коефіцієнт розведення;

$m$  — маса проби;

$V_1$  — об'єм проби.

## 2.12. Статистична обробка результатів.

Статистична обробка результатів дослідження здійснювалася за допомогою програми Microsoft Excel та Statistica. Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими в результаті досліджень (середнє арифметичне значення –  $M$ ; стандартна похибка середнього арифметичного –  $m$ ).

Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності  $p \leq 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

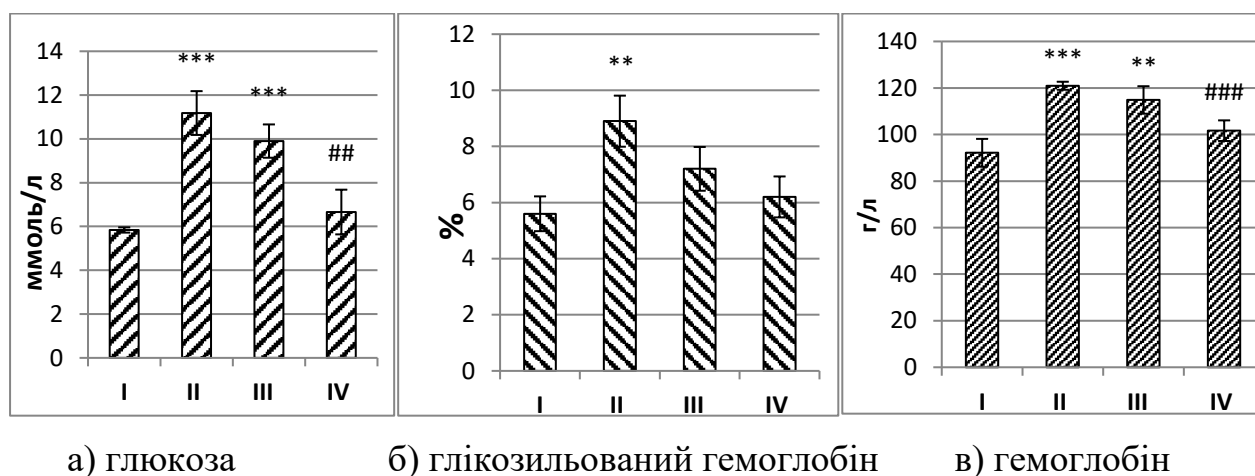
### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### **3.1. Вплив цитрату хрому в кількості 10 і 25 мкг/кг маси тіла на біохімічні процеси в організмі щурів із стрептозотоциновим діабетом.**

**3.1.1. Вплив цитрату хрому на показники вуглеводного обміну в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом.** Ступінь порушення вуглеводного обміну за цукрового діабету відображають глікозильовані протеїни. Неензиматичне приєднання глюкози до протеїну призводить спочатку до зворотних, а згодом до незворотних метаболічних порушень. Надлишкове формування продуктів раннього глікозилювання зовні й усередині клітини відбувається внаслідок нуклеофільного зв'язування глюкози з аміногрупою протеїнів з утворенням основи Шиффа, що існує протягом декількох годин, а потім повільно перетворюється в більш стабільний продукт Амадори, прикладом якого може бути глікозильований гемоглобін. У хворих на цукровий діабет глікозилювання гемоглобіну є незворотнім процесом, не залежить від наявності інсуліну, та свідчить про ступінь компенсації захворювання за останні 90 днів. Визначення глікозильованої форми гемоглобіну служить цінною діагностичною ознакою. Ступінь глікозилювання прямо пропорційна концентрації глюкози.

У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що у крові тварин II групи з стрептозоточин індукованим діабетом вірогідно зростали концентрації як глюкози, так і глікозильованого гемоглобіну, порівняно з їхнім рівнем у тварин контрольної групи, відповідно на 91 і 59 % (рис.3.1 а,б). У тварин III групи, яким до раціону додавали цитрат хрому в дозі 10 мкг/кг м.т. на тлі ЦД<sub>Е</sub>, рівень глюкози також вірогідно підвищувався на 70 % порівняно з I групою. Однак, стосовно тварин II групи у крові щурів III групи концентрація як глюкози, так і глікозильованого гемоглобіну вірогідно не змінювалася,

спостерігалася лише тенденція до їх спадання, тоді як у тварин IV групи вміст глюкози вірогідно знижувався на 59 %, а загального гемоглобіну на 91%.



**Рис. 3.1. Вміст глюкози (а), глікозильованого гемоглобіну (б) та загального гемоглобіну (в) в крові щурів із ЦДЕ (II група) та за впливу цитрату хрому в дозах 10 мкг/кг м.т. (III група) і 25 мкг/кг м.т. (IV група). Примітка (тут і надалі): \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – вірогідність змін показників II, III, IV груп порівняно до I групи; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  – вірогідність змін показників III, IV груп порівняно до II групи.**

Вміст загального гемоглобіну в крові тварин дослідних груп вірогідно підвищувався на 31 % у тварин II групи та на 24 % у тварин III групи, порівняно із тваринами I групи (рис. 3.1 в), що може бути зумовлено виходом еритроцитів із депо. Однак, у тварин IV групи, за впливу цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг, рівень загального гемоглобіну знижувався на 16 % стосовно II групи. Це може свідчити про інгібування його синтезу внаслідок недостатньої кількості Феруму, який конкурує з Хромом за здатність транспортуватися трансферином, що за певних умов може супроводжуватися зниженням забезпечення транспорту кисню до тканин.

В еритроцитах ефективність переносу глюкози через їхні зовнішні мембрани не залежить від інсуліну. Тому, за певних умов глюкоза може надходити в клітини і там метаболізуватися як по шляху гліколізу, так і пентозофосфатному. В еритроцитах тварин II групи за ЦДЕ спостерігалася

тенденція до зростання лактатдегідрогеназної активності (табл. 3.1). Зростання цієї ензиматичної активності в еритроцитах крові щурів II групи з ЦД<sub>E</sub>, може бути зумовлено збільшенням частки мономерів M-типу ізоензимного складу. Це підтверджується зростанням рівня лактату щодо пірувату в крові тварин II групи, порівняно з I групою (рис. 3.2). А зростання співвідношення лактату до пірувату за ЦД<sub>E</sub> може бути показником ступеня порушення клітинного метаболізму [295]. Оскільки піруват є попередником ацетил-КоА, первинного субстрату ЦТК, зниження його концентрації в крові тварин за ЦД<sub>E</sub> викличе і зниження загального субстратного потоку в цьому циклі.

В еритроцитах тварин IV групи за введення цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг виявлено вірогідне зниження лактатдегідрогеназної активності на 16 % порівняно із показникам варин II групи. За введення до раціону щурів цитрату хрому рівень лактату в еритроцитах тварин III групи знижувався на 42 %, в той час як рівень пірувату – зростав на 48 % у тварин IV групи стосовно II групи (рис. 3.2), що свідчить про нормалізацію метаболічних процесів в крові тварин за дії Хрому.

За умов цукрового діабету відбуваються зміни показників вуглеводного обміну, крім крові, й у тканинах. Відомо, що печінка і скелетні м'язи здатні метаболізувати глюкозу за наявності інсуліну, який синтезується  $\beta$ -клітинами підшлункової залози. Тому важливо було дослідити основні біохімічні показники саме у цих тканинах.

У дослідженнях було встановлено, що у тканинах тварин II групи за ЦД<sub>E</sub> відбувалося вірогідне зростання лактатдегідрогеназної активності у скелетних м'язах на 61 % і підшлунковій залозі на 70 % стосовно активності ензиму у тварин I групи (табл. 3.1). Активація лактатдегідрогенази в скелетних м'язах та підшлунковій залозі тварин II групи свідчить про мобілізацію енергетичних ресурсів для максимального утворення молекул АТФ, необхідних для внутрішньоклітинних процесів, транспорту катіонів через мембрану та збереження її цілісності [296].

При порівнянні лактатдегідрогеназної активності у підшлунковій залозі тварин III і IV дослідних груп з активністю ензиму у тварин I групи, було

відмічено вірогідне її підвищення на 49 і 36 % відповідно. У той час як стосовно показників у тварин II групи виявлено вірогідне зниження активності ензиму в тканинах скелетних м'язів (на 48 %) і підшлункової залози (на 6 %) тварин IV групи.

Таблиця 3.1.

**Лактатдегідрогеназна активність в еритроцитах та тканинах щурів із ЦД<sub>Е</sub> та за дії цитрату хрому, нмоль/хв. •мг протеїну (M±m; n=7)**

Досліджувані клітини та тканини	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
		I	II	III
еритроцити	30,84±1,37	35,31±1,67	32,35±4,60	29,67±1,22 <sup>##</sup>
печінка	1,43±0,5	0,50±0,09	1,18±0,16 <sup>##</sup>	1,27±0,13 <sup>###</sup>
скелетні м'язи	3,62±0,36	5,85±0,67 <sup>**</sup>	4,52±0,71	3,02±0,52 <sup>##</sup>
підшлункова залоза	4,13±0,21	7,04±0,43 <sup>***</sup>	6,16±0,52 <sup>**</sup>	5,63±0,27 <sup>***##</sup>

У печінці тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub> спостерігалось зниження лактатдегідрогеназної активності на 65 % порівняно з контролем, однак ці дані є невірогідні. Порівнюючи активність досліджуваного ензиму у тканинах печінки тварин III і IV груп з показниками у тварин II групи, було виявлено вірогідне її підвищення у 2,3 і 2,5 рази відповідно. Зростання ЛДГ-ної активності в печінці за дії цитрату хрому може свідчити про активацію як аеробних, так і анаеробних шляхів гліколізу в ній, оскільки в цій тканині переважають гібридні фракції ізоензимів [297].

Про інтенсивність перетворення глюкози у пентозо-фосфатному шляху свідчить глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність. У дослідженнях встановлено, що глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність вірогідно знижувалася в еритроцитах на 29 % і тканинах печінки на 35 % тварин II групи стосовно I (табл. 3.2), що свідчить про пригнічення метаболізму глюкози по пентозо-фосфатному шляху за ЦД<sub>Е</sub>. Це може призводити до зниження захисту гемоглобіну та



еритроцитів від денатурації і розпаду за дії різних агентів, що володіють окиснювальними властивостями [298].

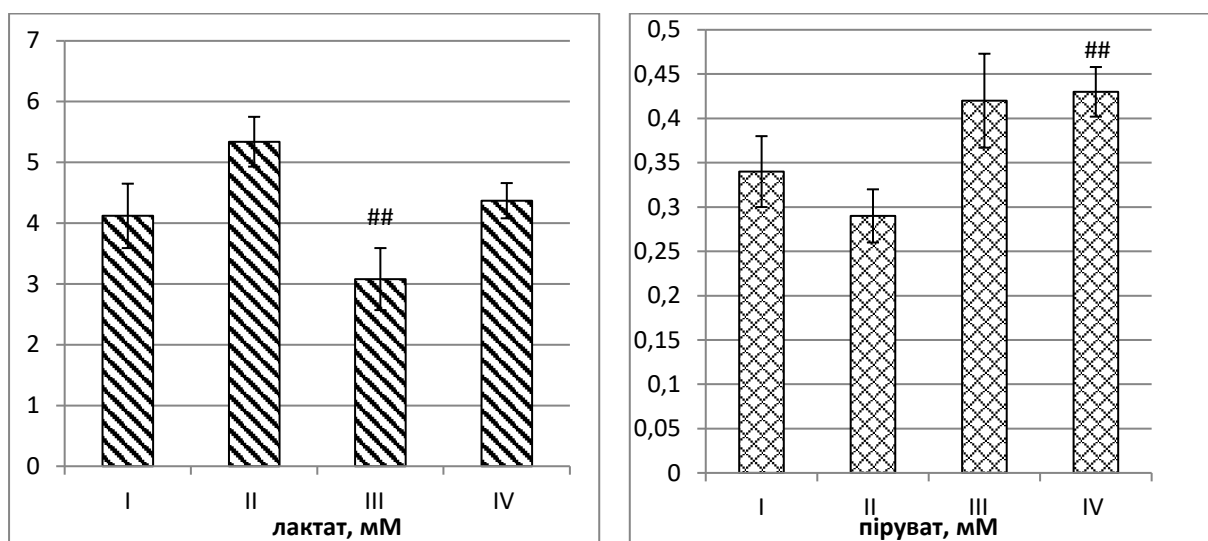


Рис. 3.2. Вміст лактату і пірувату в крові щурів за дії цитрату хрому ( $M \pm m$ ;  $n=7$ ).

У тканинах підшлункової залози тварин II групи глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність вірогідно підвищувалася на 59 % (як і ЛДГ активність) у порівнянні із ензимною активністю тварин I групи. Очевидно особливістю тканин підшлункової залози за цукрового діабету є зростання як анаеробного, так і аеробного шляху окиснення глюкози.

У тварин III дослідної групи було відмічено вірогідне зростання активності ензиму в тканинах печінки на 54% та тенденція до зростання активності даного ензиму у скелетних м'язах та еритроцитах, однак вірогідне зниження – у підшлунковій залозі на 39 % відносно тварин II дослідної групи.

Досліджуючи Г-6ФДГ-ну активність у тканинах тварин IV групи спостерігалось вірогідне її підвищення в еритроцитах на 42 %, у печінці на 57 % і тенденція до підвищення активності у скелетних м'язах порівняно з активністю ензиму у тварин II групи. В той час як у підшлунковій залозі тварин IV групи спостерігалось вірогідне зниження активності ензиму на 58 %, порівняно з тваринами II групи, та на 32 % порівняно з тваринами I групи.

**Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в еритроцитах та тканинах щурів з ЦД<sub>E</sub> за дії цитрату хрому, нмоль/хв.•мг протеїну (M±m; n=7)**

Досліджувані клітини та тканини	Групи тварин			
	контрольна	дослідні групи		
	I	II	III	IV
еритроцити	3,70±0,78	2,64±0,15***	3,58±0,76	3,74±0,37 <sup>#</sup>
печінка	1,50±0,04	0,98±0,31	1,83±0,20 <sup>#</sup>	1,54±0,12 <sup>###</sup>
скелетні м'язи	0,75±0,09	0,53±0,09	0,72±0,12	0,77±0,1
підшлункова залоза	3,42±0,27	5,44±0,33***	3,3±0,23 <sup>###</sup>	2,31±0,12 <sup>**###</sup>

Зростання глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності за дії цитрату хрому в призводить до інтенсифікації утворення НАДФН+Н<sup>+</sup> в клітинах крові та тканинах, який використовується надалі для біосинтезу різних органічних речовин, а також для підтримки оптимальної концентрації відновленого глутатіону.

**3.1.2. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів АОС в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату хрому.** У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що у плазмі крові щурів II групи з ЦД<sub>E</sub> вміст ГПЛ вірогідно підвищився на 40% у порівнянні із показниками у тварин контрольної групи (табл. 3.3). Аналогічне підвищення рівня досліджуваного продукту спостерігалось і в крові тварин III групи на 26 %, в той час у тварин IV групи – виявлено зниження його вмісту на 25 % порівняно з контрольною групою.

Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові тварин усіх дослідних груп мав тенденцію до підвищення у порівнянні із показниками тварин контрольної групи.

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові щурів  
з ЦД<sub>Е</sub> та за дії цитрату хрому мкг/кг (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,236±0,0141	0,330±0,034*	0,298±0,015*	0,176±0,02*###
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	2,848±0,319	3,336±0,149	2,953±0,072 <sup>#</sup>	2,925±0,191

Порівнюючи показники у крові тварин III і IV дослідних груп із показниками тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub>, виявлено вірогідне зниження вмісту ГПЛ у тварин IV групи на 47 % і тенденція до зниження у тварин III групи, а також вірогідне зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 11 % у тварин III групи та тенденція до зниження у тварин IV групи.

Інтенсивність вільнорадикального окиснення в організмі залежить від багатьох чинників, але, в першу чергу, детермінується злагодженим функціонуванням ензимів системи антиоксидантного захисту [299].

Відомо [223], що СОД є одним з найважливіших ензимів антиоксидантної системи організму. Цей ензим каталізує реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на молекули пероксиду гідрогену, які є менш реакційно здатними. Досліджуючи СОД-ну активність в еритроцитах крові щурів було відмічено вірогідне її зростання у тварин II групи на 28 %, а також тенденцію до підвищення у тварин III групи у порівнянні із показниками у тварин I групи (табл. 3.4). При порівнянні показників тварин дослідних груп з показниками у тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub>, було відмічено тенденцію до зниження ензиматичної активності у тварин III групи і вірогідне зниження на 21 % у тварин IV групи.

Знешкодження пероксиду гідрогену, що утворюється в результаті

дисмутації супероксидного радикалу здійснює каталаза. Виявлено вірогідне зниження активності даного ензиму у крові тварин II групи на 30 %, III групи – на 18 % і IV – на 16 %, у порівнянні із показниками тварин I групи (табл. 3.4). У той же час спостерігалася тенденція до підвищення каталазної активності в еритроцитах у тварин III групи і вірогідне зростання на 21 % у тварин IV групи порівнянно із показниками тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>.

Таблиця 3.4

**Активність ензимів антиоксидантної системи та вміст відновленого глутатіону в еритроцитах крові щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Супероксиддисмутаза, ум. од./ мг протеїну	18,4±0,90	23,6±0,92**	20,6±1,37	18,6±1,11##
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	3,73±0,16	2,60±0,14*	3,05±0,19**	3,15±0,15***##
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,44±0,03	0,23±0,03	0,29±0,02	0,31±0,02
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	11,47±0,73	9,61±0,29*	11,55±0,97	11,18±0,25##
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	0,40±0,02	0,24±0,02**	0,33±0,03#	0,38±0,02###

За оксидативного стресу особливо важливою є глутатіонова система, яка безпосередньо знешкоджує АФО, або, як „друга лінія оборони” після СОД і КТ, доповнює і завершує роботу „першої лінії” та виправляє її похибки [294].

Зокрема, знешкодження пероксиду гідрогену, окрім КТ, здійснює і ГП, спорідненість якої до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> значно вища, ніж у КТ [300].

При дослідженні ГП у тварин II групи спостерігалася вірогідне зниження її активності на 16 % і тенденція до нормалізації показників у тварин III і IV груп відносно I групи (табл. 3.4). У порівнянні із активністю ГП у крові тварин II групи спостерігалася тенденція до її підвищення у тварин III групи і вірогідне

підвищення на 16% у тварин IV групи.

Активність ГП залежить від вмісту відновленого глутатіону, внутрішньоклітинну концентрацію якого підтримує ГР. Функціонування ж ГР, у свою чергу, визначається рівнем відновлених нікотинамідних коензимів. При дослідженні активності ГР в еритроцитах щурів II групи спостерігалось вірогідне зниження її активності на 40 % у порівнянні із тваринами I групи. У тварин III і IV груп спостерігалась тенденція до зниження активності досліджуваного ензиму відносно показників тварин I групи. Порівнюючи активність ГР у тварин II групи було відмічено вірогідне зростання її активності у тварин III (на 38 %) і IV (на 58 %) груп.

При дослідженні вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах щурів спостерігалась тенденція до зниження його вмісту в усіх дослідних групах по відношенню до контролю і тенденція до підвищення у тварин III і IV груп стосовно тварин II групи (табл. 3.4).

При ЦД спостерігаються поліорганні ушкодження, у тому числі ураження тканин скелетних м'язів, печінки та підшлункової залози. При дослідженні показників про/антиоксидантної системи у тканинах щурів з ЦД<sub>E</sub> були виявлені вірогідні зміни. Зокрема у скелетних м'язах щурів II групи за ЦД<sub>E</sub>, спостерігалось вірогідне підвищення рівня ГПЛ на 86 % і ТБК-активних продуктів на 76 % у порівнянні із показниками тварин контрольної групи (табл. 3.5). Скелетні м'язи є основною тканиною нашого організму, де відбувається окиснення ліпідів, причому близько 90 % потреб в енергії в стані спокою отримується з окиснення жирних кислот. За умов виникнення ЦД посилюються процеси ПОЛ у м'язах, що супроводжується накопиченням їх продуктів, ураженням тканин та виникненням діабетичної міопатії, яка проявляється гострим болем та набряком.

За впливу цитрату хрому у скелетних м'язах тварин III групи вірогідно підвищувався вміст ТБК-активних продуктів на 33% стосовно показників у тварин I групи. Порівнюючи показники тварин III і IV дослідних груп із показниками II дослідної групи, спостерігалось вірогідне зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 24 і 36 % відповідно, та ГПЛ – на 50 % у IV групі.

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у скелетних м'язах урів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
		I	II	III
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,44±0,11	0,82±0,13*	0,53±0,14	0,41±0,09 <sup>#</sup>
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	1,62±0,20	2,85±0,11***	2,16±0,11**###	1,82±0,14###
Супероксиддисмутаза ум. од./мг протеїну	42,76±2,75	31,87±2,37*	37,59±3,32	38,73±4,42
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	6,08±0,66	4,92±0,62	7,74±0,89 <sup>#</sup>	9,68±0,73**###
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,51±0,07	0,46±0,04	0,54±0,05	0,51±0,11
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	9,4±0,38	6,81±0,35***	9,65±0,68 <sup>#</sup>	10,21±0,44###
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	1,82±0,37	1,45±0,30	2,02±0,50	1,91±0,22

Досліджуючи СОД-ну активність, спостерігалось вірогідне її зниження на 25% у м'язах тварин II дослідної групи і тенденція до зниження активності у тварин інших двох дослідних груп, що споживали цитрат хрому, у порівнянні із контролем. Вірогідних різниць між дослідними групами не було виявлено.

Досліджуючи каталазну активність, спостерігалась тенденція до зниження у м'язах тварин II групи і підвищення у тварин III групи, а у тварин IV групи було виявлено вірогідне підвищення ензиматичної активності на 59 % у порівнянні контролем (табл. 3.5). У тварин III і IV дослідних груп спостерігалось вірогідне підвищення каталазної активності на 57 і 97 % відповідно, у порівнянні з тваринами II групи з ЦД<sub>E</sub>.

При дослідженні ГР-ної активності і вмісту ВГ у тканинах скелетних м'язів вірогідних змін не виявлено, лише спостерігалася тенденція до зниження у тварин II групи стосовно контролю та тенденція до підвищення у тварин III і IV груп у порівнянні з II групою.

При дослідженні ГП-ної активності спостерігалася вірогідне її зниження у м'язах тварин II групи на 27 % та тенденція до підвищення у тварин III і IV груп у порівнянні із контролем. Порівнюючи показники у м'язах тварин III і IV груп із II групою, спостерігалася вірогідне підвищення ГП-ої активності на 42 і 50 % відповідно.

Порушення функціонального стану печінки при цукровому діабеті також трапляється часто й зумовлено здебільшого зниженням запасів глікогену в гепатоцитах і їх жировим переродженням [301]. В основі порушень метаболічних процесів у печінці лежить кисневе голодування клітин та порушення мікроциркуляції, що у подальшому може призводити до клітинної деструкції з ураженням мітохондрій і зниженням інтенсивності окисного фосфорилування.

При дослідженні продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тканині печінки щурів II групи з ЦД<sub>E</sub> було встановлено вірогідне підвищення вмісту ГПЛ на 36 % та ТБК-активних продуктів – на 25 %, а також тенденція до їх підвищення у III і IV групах порівняно з контролем (табл. 3.6).

Порівнюючи показники ПОЛ у печінці тварин III і IV дослідних груп із показниками тварин II групи, спостерігалася лише вірогідне зниження вмісту ГПЛ у тварин IV групи на 22%. Крім того була виявлена тенденція до зниження вмісту ТБК-активних продуктів у печінці тварин III і IV дослідних груп та ГПЛ у тварин III групи у порівнянні із показниками тварин II групи.

При дослідженні СОД-ної активності у печінці щурів дослідних груп вірогідних змін не спостерігалася, однак виявлена тенденція до її підвищення по відношенню до контролю.

Досліджуючи каталазну активність у печінці щурів II групи з ЦД<sub>E</sub> виявлено вірогідне її зниження на 22 % у порівнянні із контролем (табл. 3.6). Порівнюючи активність даного ензиму у тварин III і IV груп із показниками тварин I групи

вірогідних змін не спостерігалось, однак стосовно II групи виявлено вірогідне підвищення каталазної активності на 23 і 25 % відповідно.

Таблиця 3.6

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у печінці щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,44±0,029	0,60±0,049**	0,52±0,046	0,47±0,032#
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	3,42±0,19	4,28±0,24**	3,97±0,19	3,77±0,37
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	23,09±0,81	25,39±1,31	25,43±1,34	23,56±1,55
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	18,78±1,47	14,74±0,76*	18,11±1,19#	18,5±1,23##
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	1,16±0,075	0,92±0,079*	1,16±0,066#	1,23±0,064#
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	21,62±1,28	17,11±0,97**	19,21±1,6	23,56±2,27##
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	5,12±0,69	4,03±0,76	5,00±0,62	5,04±0,69

При дослідженні ГР-ної активності у печінці щурів вірогідних змін у дослідних групах не спостерігалось, однак виявлена тенденція до її зниження в II групі по відношенню до контролю.

При дослідженні вмісту ВГ у тканинах печінки спостерігалось вірогідне його зниження у тварин II групи на 21 % і тенденція до підвищення у тварин IV групи по відношенню до контрольної групи. У порівнянні з рівнем ВГ у тварин II групи спостерігалось вірогідне його підвищення на 21 % у тварин III групи і на 33 % у тварин IV групи.

Досліджуючи ГП-ну активність спостерігалось вірогідне її зниження на 21



% у тварин II групи, тенденція до зниження у тварин III групи та підвищення у тварин IV групи у порівнянні із контролем. Порівнюючи ГП-ну активність у печінці тварин дослідних груп спостерігалася тенденція до підвищення у тварин III групи і вірогідне підвищення на 38 % у тварин IV групи, порівняно до показників у тварин II групи.

Відомо, що порушення балансу між активністю дії прооксидантних чинників і ефективністю антиоксидантної системи організму, яке викликає оксидативний стрес, є універсальним механізмом розвитку ЦД. Відмічено пряму залежність між ступенем ПОЛ у підшлунковій залозі та вираженістю її функціональних порушень. Вважається, що в основі розвитку цих змін лежить ураження клітин острівкового апарату залози, у результаті чого зменшується кількість і активність  $\beta$ -клітин, число рецепторів інсуліну, розвивається інсулінорезистентність із поступовим порушенням вуглеводного та ліпідного обміну.

Було встановлено, що у підшлунковій залозі щурів II групи з ЦД<sub>E</sub> вірогідно підвищувався вміст ТБК-активних продуктів на 20 % та спостерігалася тенденція до підвищення ГПЛ. Аналогічну тенденцію до підвищення вмісту продуктів ПОЛ виявлено у тварин III групи стосовно контролю. Порівнюючи показники ПОЛ у підшлунковій залозі тварин III і IV груп із II групою спостерігалася тенденція до зниження вмісту продуктів ПОЛ у тварин III групи і вірогідне зниження ТБК-активних продуктів у тварин IV групи на 21 % (табл. 3.7).

Досліджуючи СОД-ну активність у підшлунковій залозі щурів було відмічено вірогідне її зростання у тварин II групи на 42 %, III групи – на 41 % і IV – на 24 % у порівнянні з показниками тварин I групи. Крім цього, спостерігалася вірогідне зниження активності ензиму на 13% у тварин IV групи стосовно показників у тварин II групи.

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії хром цитрату ( $M \pm m$ ,  $n=7$ ).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,56±0,069	0,74±0,064	0,64±0,081	0,54±0,083
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	1,63±0,094	1,96±0,076*	1,72±0,082	1,55±0,163###
СОД, ум. од./мг протеїну	32,73±1,43	46,47±1,55***	46,30±1,48***	40,56±2,12***
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	7,93±0,69	4,56±0,42**	6,37±0,72	7,18±0,44###
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,97±0,048	0,59±0,035***	0,87±0,046###	0,95±0,048###
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	26,64±2,24	22,34±0,89	26,07±1,41#	26,73±1,08##
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	5,67±0,54	3,14±0,36**	4,37±0,43##	4,79±0,36###

При дослідженні КТ-ної активності у підшлунковій залозі тварин II групи спостерігалось вірогідне її зниження на 42 % у порівнянні із показниками у тварин контрольної групи, а також тенденція до зниження у тварин III і IV дослідних груп. Порівнюючи показники тварин III і IV груп із тваринами II групи, спостерігалась тенденція до зростання активності ензиму у тварин III групи та вірогідне підвищення у IV групі на 57 %.

При дослідженні вмісту ВГ у підшлунковій залозі щурів спостерігалось вірогідне зниження на 39 % у тварин II групи і тенденція до зниження його вмісту у тварин III групи по відношенню до контролю. У той же час спостерігалось

вірогідне підвищення вмісту ВГ у тварин III і IV груп порівнюючи з тваринами II групи на 47 і 61 % відповідно.

При дослідженні ГП-ної активності у підшлунковій залозі тварин усіх дослідних груп не було відмічено вірогідних змін у порівнянні з показниками тварин I групи. Проте порівнюючи показники тварин III і IV груп із активністю досліджуваного ензиму у тварин II групи було відмічено вірогідне підвищення активності на 17 і 20 % відповідно.

Досліджуючи ГР-ну активність у підшлунковій залозі тварин II групи було виявлено вірогідне її зниження на 45 % і тенденція до зниження у тварин III і IV груп порівнянно із контролем. Порівнюючи показники III і IV дослідних груп із II групою, спостерігалось вірогідне підвищення активності досліджуваного ензиму на 39 і 53 % відповідно.

За умов ЦД спостерігається енергетичне виснаження організму, яке зумовлене виникненням дефіциту енергетичних субстратів, що прямо пропорційно впливає на ефективність захисних систем.

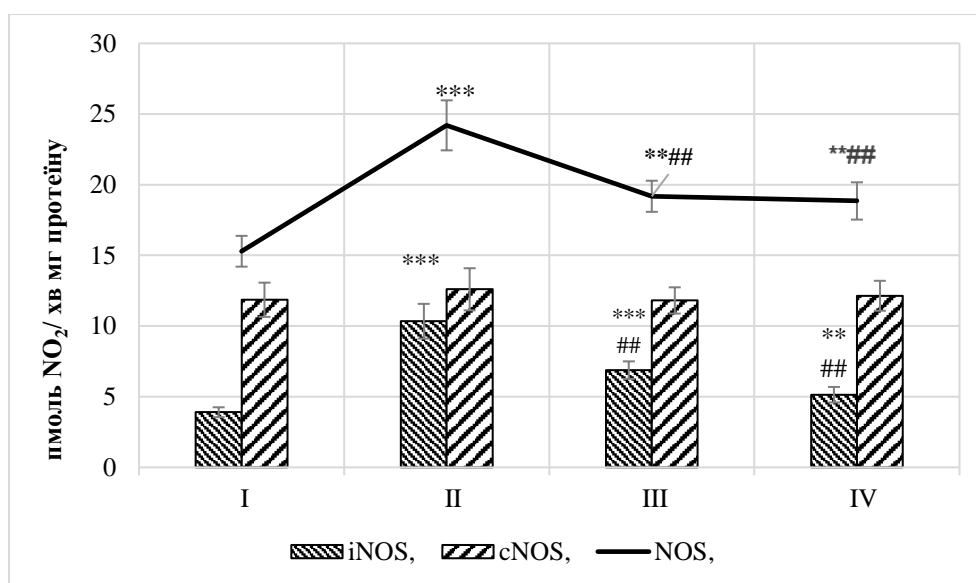
Проте додаткове введення хром цитрату в раціон щурів сприяє нормалізації активності досліджуваних ензимів до рівня контролю, що очевидно зумовлено опосередкованою дією елемента через гормон інсулін на АОС організму тварин.

**3.1.3. Стан NO-синтазної системи в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом за впливу цитрату хрому.** За цукрового діабету негативні наслідки підвищеного рівня глюкози в крові проявляються як інтенсифікацією оксидативного стресу, так і розвитком ендотеліальних дисфункцій [10]. Ендотеліальна дисфункція проявляється за відсутності синтезу або біодоступності нітроген оксиду (NO), внаслідок зменшення його продукції та/або інактивації АФО, що утворюються або шляхом глікозилювання протеїнів, або безпосередньо з ендотелію судин [12].

У процесі виконання роботи встановлено, що за умов стрептозоточин індукованого діабету в еритроцитах щурів II групи спостерігалось вірогідне зростання активності загальної NOS на 58 % та індукбельної NOS у 2,6 рази, в

той час як активність конститутивної NOS вірогідно не змінювалася відносно показників тварин I групи (рис. 3.3). Імовірно, підвищення активності досліджуваних ензимів відбувалося внаслідок збільшення внутрішньоклітинного рівня м-РНК індукційної NOS за гіперглікемії [302].

За умов додавання цитрату хрому у кількості 10 і 25 мкг/кг м.т тваринам III і IV груп на тлі ЦД<sub>E</sub> спостерігалось вірогідне підвищення активності загальної NOS на 25 і 23 % та іNOS у 1,8 і 1,3рази відповідно, відносно показників тварин I групи (рис. 3.3).



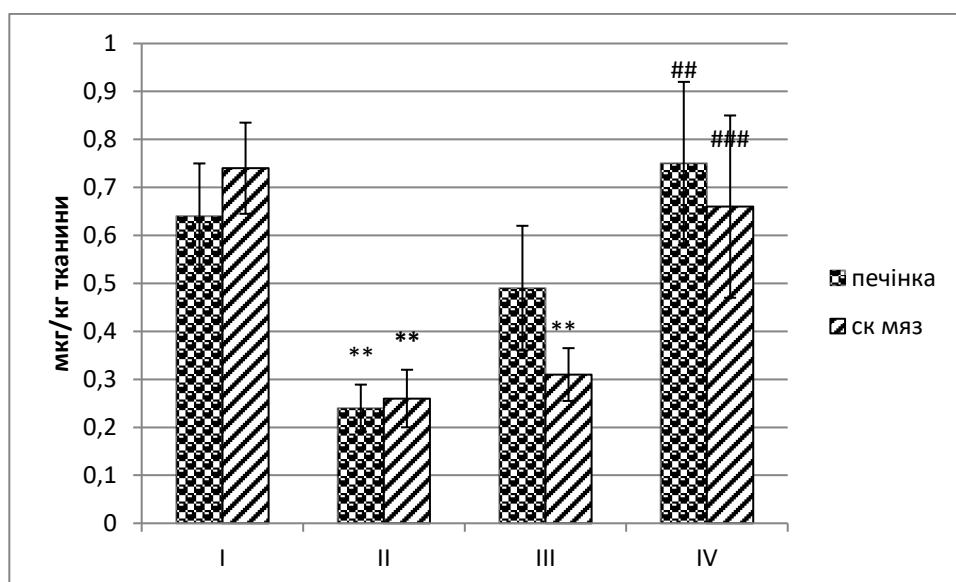
**Рис 3.3. NO-синтазна активність у еритроцитах щурів з експериментальним діабетом і та за впливу цитрату хрому.**

Порівнюючи показники III і IV дослідних груп із показниками II групи із ЦД<sub>E</sub> спостерігалось вірогідне зниження активності загальної NOS на 21 і 22 %, іNOS на 34 і 50 %, в той час як активність cNOS не змінювалася вірогідно.

Отримані дані свідчать про позитивну дію цитрату хрому, що призводить до зниження іNOS активності в еритроцитах за ЦД. Можливо сполука Хрому пригнічує активність іNOS внаслідок безпосереднього модифікування ензимної молекули через кофактори. Крім цього, це може відбуватися внаслідок регулювання захисних механізмів або індукції гіперчутливості [303].

**3.1.4. Вміст Хрому в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату хрому.** Перебіг ЦД, його тривалість і прогресування відбувається на тлі мікроелементних зрушень. На сьогоднішній час встановлено що ЦД відносять до мікроелементозів, оскільки, це захворювання супроводжується порушенням метаболізму багатьох мікроелементів. Важливе значення в патогенезі ЦД серед мікроелементів надають Хрому.

У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що у тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> вірогідно знижувався вміст Хрому у тканинах печінки у 2,6 раза та скелетних м'язів – у 2,8 раза у порівнянні із тваринами контрольної групи (рис. 3.4).



**Рис. 3.4. Вміст Хрому в тканинах щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату хрому.**

У тканинах тварин III дослідної групи спостерігалось вірогідне зниження вмісту Хрому у 2,4 рази у скелетних м'язах і тенденція до зниження вмісту елемента у печінці порівняно з тваринами контрольної групи. У той час як стосовно тварин II групи спостерігалася тенденція до підвищення вмісту Хрому у досліджуваних тканинах. При додаванні у раціон тварин IV групи цитрату хрому у дозі 25 мкг/кг у тканинах печінки і скелетних м'язів виявлено вірогідне підвищення вмісту Хрому, відповідно у 3,1 і 2,5 рази, порівняно із його рівнем у

тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> проте стосовно контрольної групи вірогідних змін не спостерігалось.

Таким чином, перебіг ЦД супроводжується змінами в показниках мікроелементного складу тканин організму, що може сприяти прогресуванню захворювань та сприяти формуванню ускладнень. При додаванні у раціон тварин цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг у тканинах печінки і скелетних м'язів рівень мікроелементу нормалізувався, а саме – його вміст вірогідно підвищився, порівняно із рівнем у тканинах тварин із цукровм діабетом.

### **Висновки:**

1. У крові щурів II групи із ЦД<sub>E</sub> виявлено зростання рівня глюкози, глікозильованого та загального гемоглобіну, підвищення лактатдегідрогеназної активності у скелетних м'язах та підшлунковій залозі, зростання глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності в підшлунковій залозі, однак зниження в еритроцитах крові.

2. За дії цитрату хрому в дозах 10 і 25 мкг/кг у тварин III і IV груп лактатдегідрогеназна активність знижувалася в еритроцитах крові, скелетних м'язах і підшлунковій залозі, в той час як у печінці – зростала; глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність – зростала в еритроцитах крові, печінці та знижувалась у підшлунковій залозі.

3. У крові та тканинах тварин із ЦД<sub>E</sub> зростав вміст продуктів ПОЛ, в той час як за дії цитрату хрому їх вміст знижувався. У тварин з ЦД<sub>E</sub> в еритроцитах СОД-на активність зростала, в той час як КТ-, ГП- і ГР-на активності – знижувалися; у скелетних м'язах – СОД- і ГП-на активності знижувалися; у печінці – КТ-, ГП-на активності та вміст ВГ знижувалися; у підшлунковій залозі – СОД-на активність зростала, а КТ-, ГР-на активності та вміст ВГ – знижувалися.

4. За дії цитрату хрому в дозах 10 і 25 мкг/кг в еритроцитах СОД-на активність знижувалась, КТ-, ГП-, ГР-на – зростали; у скелетних м'язах – КТ-, ГП-на активність зростали; у печінці – КТ-, ГП-активність та вміст ВГ – зростали; у

підшлунковій залозі – СОД-на активність знижувалася, КТ-, ГП-, ГР-на та вміст ВГ – зростали.

5. В еритроцитах тварин із ЦД<sub>Е</sub> зростала загальна та індукцйбельна NOS активність. За додавання цитрату хрому активність цих ензимів знижувалась порівняно із тваринами з ЦД<sub>Е</sub>, які не споживали хрому.

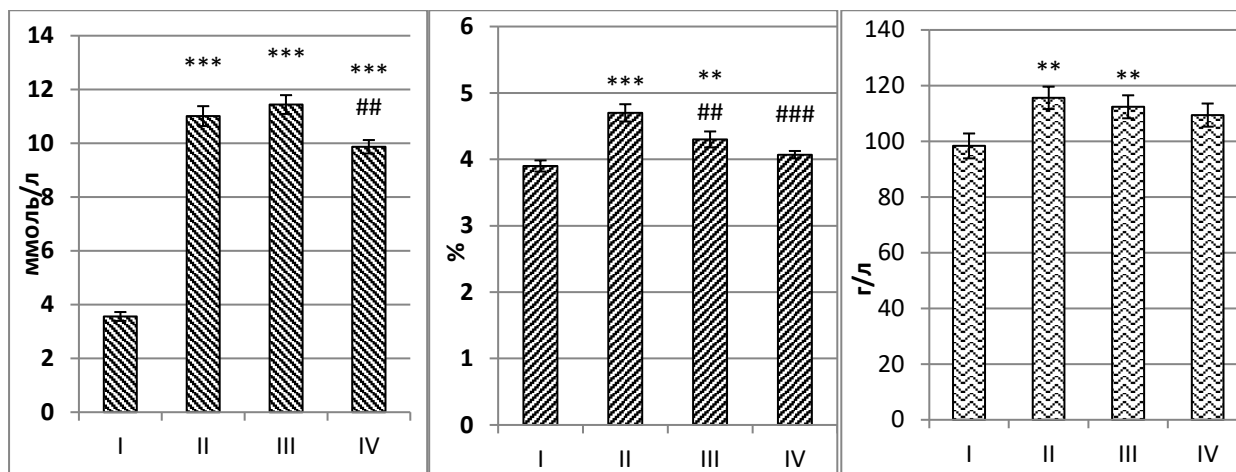
6. Вміст Хрому у печінці і скелетних м'язах знижувався за ЦД<sub>Е</sub>, однак зростав за умов додавання цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг.

Результати підрозділу опубліковані у працях [304-313 ].

### **3.2. Вплив цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг маси тіла на біохімічні процеси в організмі щурів із стрептозотоциновим діабетом.**

**3.2.1. Вплив цитрату цинку на показники вуглеводного обміну в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом.** При дослідженні показників вуглеводного обміну в організмі щурів з ЦД<sub>Е</sub> у другій серії досліджень було встановлено, що рівень глюкози в плазмі крові тварин II групи вірогідно зростав утричі порівняно з її рівнем у тварин контрольної групи. У тварин III і IV груп, яким на тлі ЦД<sub>Е</sub> до основного раціону додавали розчин цитрату цинку, в дозах 20 і 50 мг Zn/кг м.т., також спостерігалось вірогідне підвищення рівня глюкози в плазмі крові, відповідно в 3,2 і 2,7 рази, у порівнянні з рівнем даного показника у тварин I групи. Однак, у крові щурів IV групи спостерігалось вірогідне зниження концентрації глюкози на 10 % порівняно до показника у тварин II групи (рис. 3.5).

Відносний вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA<sub>1c</sub>) у крові тварин II групи вірогідно зріс на 20 % у порівнянні з рівнем у тварин I групи (рис. 3.5 б). Спостерігалось також вірогідне підвищення рівня HbA<sub>1c</sub> на 10 % у тварин III групи і тенденція до підвищення у тварин IV групи у порівнянні з контролем. Порівнюючи відносний вміст HbA<sub>1c</sub> у крові тварин III і IV груп стосовно II групи, виявлено вірогідне його зниження на 9 і 13 % відповідно.



а) глюкоза

б) глікозильований гемоглобін

в) гемоглобін

Рис.3.5. Вміст глюкози (а), глікозильованого гемоглобіну (б) та загального гемоглобіну (в) в крові щурів з ЦД<sub>Е</sub> та за впливу цитрату цинку.

Концентрація загального гемоглобіну у крові тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub> вірогідно підвищувалася на 18 % у порівнянні із показниками тварин контрольної групи. Також вірогідне підвищення на 14 % даного показника спостерігалось у тварин III групи і тенденція до зростання у тварин IV групи порівняно із контролем. У тварин III і IV груп спостерігалася тенденція до зниження концентрації загального гемоглобіну в крові у порівнянні із показниками у тварин II групи.

Глюкоза з плазми надходить в клітини крові та інших тканин, де метаболізується різними шляхами. За лактатдегідрогеназною активністю можна зробити висновок про інтенсивність утилізації глюкози по гліколітичному шляху. Лактатдегідрогеназна активність у тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub> вірогідно підвищувалася в еритроцитах на 29 %, тканинах печінки – на 76 %, скелетних м'язів – на 19 % та підшлункової залози – на 28 % стосовно активності даного ензиму у тканинах тварин контрольної групи (табл. 3.8).

На тлі зростання лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub> спостерігалось вірогідне зниження вмісту пірувату на 24 % і підвищення вмістулактату на 65 %, у порівнянні з показниками тварин контролю (рис. 3.6).



Проте при порівнянні досліджуваного ензиму в тканинах тварин III та IV груп із контрольною групою, було відмічено лише вірогідне зростання ЛДГ-ної активності в еритроцитах на 98 % та печінці – на 48 % у тварин III групи, а в тварин IV групи спостерігалася лише тенденція до зростання ензиматичної активності в усіх тканинах.

Таблиця 3.8

**Лактатдегідрогеназна активність в еритроцитах та тканинах щурів з ЦДЄ за дії цитрату цинку, нмоль/хв. × мг протеїну (M±m; n=7)**

Досліджувані клітини та тканини	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
		I	II	III
еритроцити	38,79±1,9	50,07±0,92***	76,87±2,5***###	41,9±2,04##
печінка	1,68±0,12	2,96±0,18***	2,5±0,14***	1,96±0,06###
скелетні м'язи	3,86±0,14	4,59±0,17**	4,13±0,12##	4,08±0,08##
підшлункова залоза	5,24±0,38	6,72±0,46**	6,35±0,63	6,11±0,21

Однак порівнюючи ензиматичну активність у тварин III дослідної групи з тваринами II групи, було відмічено вірогідне зниження ЛДГ активності у тканинах скелетних м'язів на 10 % та незначна тенденція до зниження у тканинах печінки і підшлункової залози, однак вірогідне підвищення активності на 53 % в еритроцитах.

У тварин IV групи спостерігалася вірогідне зниження активності досліджуваного ензиму в еритроцитах на 16%, тканинах скелетних м'язів – на 11 % та печінки – на 34 % стосовно показників у тварин II групи.

У той же час, на тлі змін ЛДГ-ної активності в еритроцитах за дії цитрату цинку у тварин III і IV груп стосовно II групи, рівень лактату вірогідно знижувався на 16 і 44 %, в той час як рівень пірувату – вірогідно зростав у тварин IV групи на 12 %, однак знижувався у тварин III групи на 25 % (рис. 3.6).

Загалом, отримані дані вказують на зворотній зв'язок між вмістом Цинку в раціоні щурів та лактатдегідрогеназною активністю.

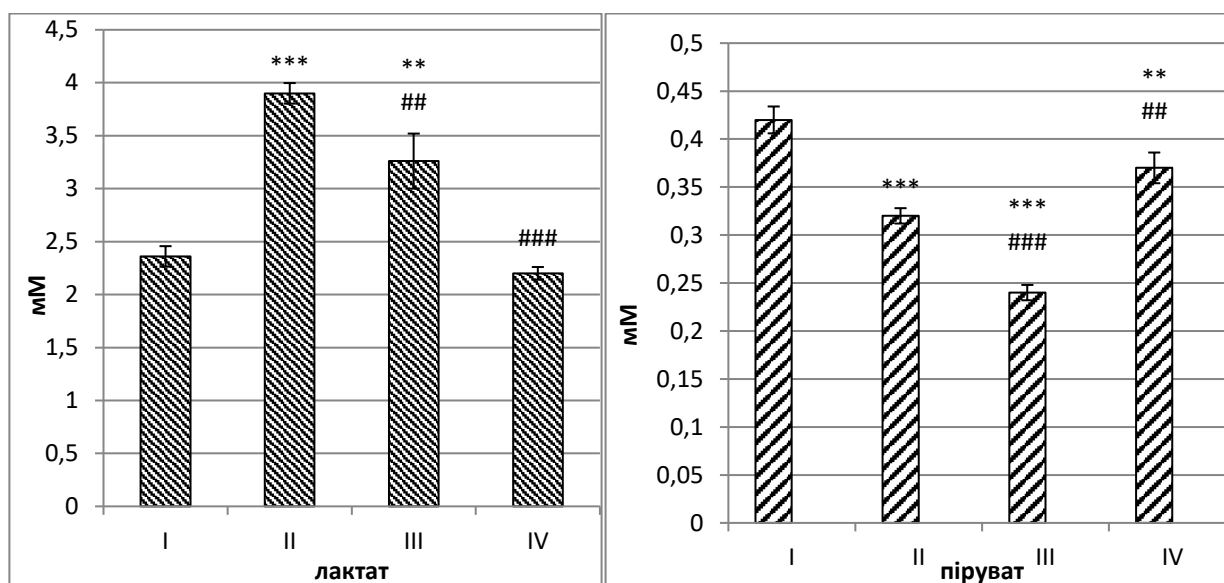


Рис 3.6. Вміст лактату і пірувату в крові щурів з ЦД<sub>Е</sub> за дії цитрату цинку.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність у досліджуваних тканинах тварин дослідних груп мала різноплановий характер (табл. 3.9). Встановлено, що глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність у щурів II групи вірогідно знижувалася в еритроцитах у 3,4 рази, у тканинах печінки – на 48 % і скелетних м'язів – на 36 %, а в підшлунковій залозі вірогідно підвищувалася на 28 % у порівнянні з показниками активності даного ензиму у тварин I групи. Отже, у тканинах тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub>, крім підшлункової залози, було відмічено гальмування у перетворенні глюкози через ПФШ.

У тварин III групи порівняно з контролем спостерігалось вірогідне зниження Г-6Ф-ДГ-ої активності в еритроцитах утричі, у тканинах печінки – на 29 %, скелетних м'язів – на 24 %, в той час як у підшлунковій залозі – підвищення на 22 %.

У тварин IV групи спостерігалось вірогідне зниження ензиматичної активності в еритроцитах на 32 % та тканинах скелетних м'язів – на 19 %, а в

тканинах печінки виявлено вірогідне підвищення активності на 15 %, у порівнянні з показниками даного ензиму у тварин I групи.

Таблиця 3.9

**Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в еритроцитах та тканинах щурів з ЦД<sub>E</sub> за дії цитрату цинку, нмоль/хв × мг протеїну (M±m; n=7)**

Досліджувані клітини та тканини	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
еритроцити	12,83±0,44	3,76±0,22 <sup>***</sup>	4,21±0,23 <sup>***</sup>	8,78±0,187 <sup>***###</sup>
печінка	3,62±0,06	1,89±0,14 <sup>***###</sup>	2,58±0,05 <sup>***###</sup>	4,18±0,19 <sup>***###</sup>
скелетні м'язи	0,631±0,037	0,402±0,028 <sup>***</sup>	0,481±0,043 <sup>**</sup>	0,507±0,025 <sup>***##</sup>
підшлункова залоза	4,13±0,24	5,28±0,42 <sup>**</sup>	5,02±0,32 <sup>**</sup>	4,65±0,18

Стосовно тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>, було відмічено вірогідне підвищення Г-6-ФДГ-ної активності в 1,4 раза у печінці тварин III групи, а також в еритроцитах – у 2,3 раза, печінці – в 2,2 раза і скелетних м'язях – в 1,3 раза у тварин IV групи. Отримані результати свідчать про інтенсивність перетворення глюкози в пентозофосфатному шляху в еритроцитах крові, тканинах печінки і скелетних м'язів, яка на пряму залежить від рівня Цинку в раціоні щурів.

Слід відмітити, що рівень Цинку в раціоні в дозі 50 мг Zn/кг м.т. мав кращий позитивний вплив на окремі показники вуглеводного обміну в організм тварин, ніж у тварин яким до раціону додатково додавали 20 мг Zn/кг м.т.

**3.2.2. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів АОС в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату цинку.** На фоні гіперглікемії при ЦД<sub>E</sub> активується низка метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення активних форм Оксигену, насамперед супероксиданіона (O<sub>2</sub>•-), який, взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на високореакційноздатний

гідроксил-радикал (HO<sup>•</sup>), синглетний кисень (O<sub>2</sub><sup>1</sup>), пероксид гідрогену (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) та пероксинітрит (ONOO<sup>-</sup>) [314]. Саме за участі вільних радикалів - продуктів відновлення Оксигену і відбувається пероксидне окиснення ліпідів.

При дослідженні показників пероксидного окиснення ліпідів у крові та тканинах тварин у другій серії досліджень було встановлено, що в плазмі крові щурів II групи з ЦД<sub>E</sub> вміст ГПЛ вірогідно підвищився на 91 % у порівнянні із показниками у тварин контрольної групи. При додаванні у раціон тварин цитрату цинку у тварин III і IV груп виявлена тенденція до підвищення вмісту досліджуваного продукту порівняно із I групою, та вірогідне зниження показників на 37 і 47 % відповідно, у порівнянні із показниками тварин II групи (табл. 3.10).

*Таблиця 3.10*

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату цинку (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,52±0,017	0,99±0,13**	0,63±0,061#	0,53±0,02##
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	3,84±0,106	3,94±0,136	3,9±0,096	3,6±0,105

При дослідженні вмісту ТБК-активних продуктів в плазмі крові тварин дослідних груп вірогідних змін не виявлено стосовно контролю. Спостерігалася лише тенденція до їх зростання в II і III групі відносно контрольної групи та тенденція до зниження вмісту ТБК-активних продуктів у тварин IV дослідної групи, відносно як I, так і II групи (табл. 3.10).

Антиоксидантна система спрямована на регуляцію інтенсивності процесів ПОЛ і захист від руйнівної дії продуктів ліпопероксидації. Супероксиддисмутаза безпосередньо забезпечує обрив вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів на так званій «нульовій» стадії вільнорадикального окиснення[223].

Досліджуючи супероксиддисмутазну активність в еритроцитах крові щурів (табл. 3.11) було відмічено вірогідне її зростання у тварин II групи – на 17 %, у тварин III і IV груп – на 11 % у порівнянні із показниками тварин I групи, що свідчить про зростання кількості субстрату реакції за ЦД<sub>E</sub> – супероксиданіону. При порівнянні активності досліджуваного ензиму у тварин III і IV групи із показниками тварин II групи, не було відмічено вірогідних змін, лише тенденцію до зниження ензиматичної активності.

У результаті проведених досліджень не було виявлено вірогідних змін каталазної активності в еритроцитах щурів дослідних груп стосовно показників у тварин I та II груп (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

**Активність ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату цинку (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	22,74±0,71	26,53±0,51 <sup>***</sup>	25,17±0,43 <sup>**</sup>	25,17±0,42 <sup>**</sup>
Каталаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	18,95±1,4	18,18±0,37	18,51±0,53	19,15±0,26
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,73±0,027	0,62±0,066	0,97±0,055 <sup>#</sup>	0,77±0,065
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	23,05±0,70	16,57±0,37 <sup>***</sup>	24,22±1,18 <sup>###</sup>	23,70±0,32 <sup>###</sup>
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	1,36±0,01	1,25±0,03 <sup>**</sup>	1,52±0,09 <sup>##</sup>	1,33±0,07

Аналізуючи показники вмісту відновленого глутатіону у даній серії досліджень, не спостерігалось вірогідних змін у тварин усіх дослідних груп у порівнянні із контролем, однак при додаванні у раціон щурів III групи цитрату цинку у дозі 20 мг/кг, було відмічено вірогідне підвищення його вмісту на 56 % у порівнянні із тваринами II групи.

Досліджуючи глутатіонпероксидазну активність в еритроцитах тварин II групи (табл.3.11) спостерігалось вірогідне її зниження на 28 % стосовно

контролю. У тварин III і IV дослідних груп вірогідних змін не спостерігалось у порівнянні з активністю ензиму у тварин I групи, однак порівняно з II групою виявлено вірогідне підвищення активності ензиму на 46 і 43 % відповідно.

При дослідженні глутатіонредуктазної активності у тварин II групи спостерігалось вірогідне її зниження на 8% порівняно з контролем. Крім цього, було виявлено вірогідне підвищення активності ензиму у тварин III на 22 % стосовно II групи, та тенденцію до підвищення стосовно I групи.

Зниження активності ензимів глутатіонової системи за умов ЦД<sub>E</sub> може свідчити про їх неензиматичне глікозилювання внаслідок гіперглікемії [223]. У той час як цитрат цинку за ЦД<sub>E</sub> сприяв нормалізації активності ензимів глутатіонового пулу.

У другій серії досліджень зміни вмісту продуктів ПОЛ та активності ензимів АОС стосувалися і досліджуваних тканин тварин із ЦД<sub>E</sub> і за впливу цитрату цинку.

За результатами експериментальних досліджень вміст ГПЛ у скелетних м'язах вірогідно збільшувався у тварин II групи в 3,1 раза та IV групи – в 1,6 рази, в той час як у тварин III групи спостерігалась тенденція до підвищення порівняно з контрольною групою. Порівнюючи показники III і IV груп із показниками вмісту досліджуваного продукту у тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>, спостерігалось вірогідне їх зниження на 49 % (табл. 3.12).

У скелетних м'язах щурів було виявлено вірогідне підвищення ТБК-активних продуктів у тварин II, III і IV дослідних груп на 40, 60 і 23 % відповідно, у порівнянні із показниками тварин контрольної групи. Проте порівнюючи вміст ТБК-активних продуктів у м'язах тварин III і IV групи з аналогічними показниками у тварин II групи вірогідних змін не виявлено, лише тенденцію до зниження у IV групі (табл. 3.12).

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у скелетних м'язах щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату цинку (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,15±0,005	0,47±0,048***	0,24±0,045##	0,24±0,019***##
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	1,49±0,08	2,09±0,14**	2,38±0,18***	1,84±0,06**
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	63,43±1,05	51,67±0,85***	41,67±0,58***##	65,68±0,88###
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	18,78±0,97	11,35±0,32***	11,48±0,72***	14,48±0,83***##
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,33±0,015	0,26±0,031	0,32±0,038	0,32±0,021
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	27,3±2,6	18,68±0,99**	24,27±2,38	22,46±0,72##
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	0,47±0,045	0,21±0,008***	0,57±0,045###	0,59±0,017***##

Досліджуючи активність ензимів АОС у скелетних м'язах тварин дослідних груп було виявлено вірогідне зниження СОД-ої активності на 18 % у тварин II групи і на 34 % – у тварин III групи, у порівнянні з активністю у тварин I групи. Порівнюючи показники активності ензиму у тварин дослідних груп, порівняно із показниками у скелетних м'язах тварин II групи, спостерігалось вірогідне їх зниження на 19 % у тварин III групи і підвищення на 27 % – у тварин IV групи. Зростання активності ензиму у тварин IV групи може бути зумовлено дією Цинку, як структурного компоненту супероксиддисмутази.

У результаті проведених досліджень було виявлено, що у тканинах скелетних м'язів щурів II, III і IV дослідних груп спостерігалось вірогідне зниження каталазної активності на 40, 39 і 23 % відповідно, порівняно із показниками тварин контрольної групи. При додаванні в раціон тварин IV групи цитрату цинку в дозі 50 мг/кг, спостерігалось вірогідне підвищення КТ-ної активності на 28 % стосовно тварин II групи (табл. 3.12).

У результаті проведених досліджень було виявлено, що у тканинах скелетних м'язів щурів дослідних груп не спостерігалось вірогідних змін вмісту відновленого глутатіону стосовно показників у тварин I і II груп.

Досліджуючи глутатіонпероксидазну активність виявлено вірогідне її зниження у тварин II групи на 32 %, а також тенденцію до зниження у тварин III і IV груп у порівнянні із показниками тварин контрольної групи. Крім цього, активність досліджуваного ензиму у м'язах тварин IV групи вірогідно підвищувалася на 20 % у порівнянні із II групою.

При дослідженні глутатіонредуктазної активності спостерігалось вірогідне її зниження у скелетних м'язах тварин II групи на 55 % та підвищення у тварин III і IV дослідних груп, порівняно із тваринами контрольної групи. Проте, порівнюючи ГР-ну активність у тварин III і IV дослідних груп із показниками тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub>, спостерігалось її зростання в 1,7 та 1,8 раза відповідно.

За впливу цитрату цинку відбувалися зміни про/антиоксидантної системи у печінці щурів із ЦД<sub>Е</sub>. Досліджуючи вміст ГПЛ у тканинах печінки тварин дослідних груп вірогідних змін не спостерігалось (табл. 3.13), лише виявлена тенденція до підвищення їх вмісту у щурів II і IV груп у порівнянні із тваринами контрольної групи та тенденція до зниження вмісту досліджуваного продукту у тварин III групи у порівнянні із тваринами II групи.

Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах печінки щурів II групи із ЦД<sub>Е</sub> вірогідно підвищувався на 37 %, а у тварин III групи спостерігалася тенденція до їх підвищення у порівнянні із тваринами контрольної групи. Встановлено вірогідне зниження вмісту досліджуваного продукту у печінці тварин IV групи на 27 % порівняно із тваринами II групи.



**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у печінці щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату цинку (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,16±0,01	0,24±0,061	0,15±0,04	0,21±0,026
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	3,56±0,15	4,88±0,31**	4,23±0,33	3,54±0,04###
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	39,37±1,11	41,88±1,25	45,58±1,95**	35,04±1,15** ###
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	8,77±0,48	7,57±0,37	7,42±0,40	9,72±0,09###
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	4,6±0,33	1,73±0,26***	6,33±0,27**###	5,41±0,37###
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	9,02±0,34	6,37±0,31***	6,99±0,44**	11,07±0,44** ###
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	1,53±0,12	0,82±0,13**	0,81±0,16**	1,86±0,15###

Досліджуючи СОД-ну активність у тканинах печінки щурів було відмічено тенденцію до підвищення у тварин II групи, вірогідне підвищення на 16 % – у тварин III групи і зниження на 11 % – у тварин IV групи у порівнянні із контролем. При порівнянні з показниками тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>, було відмічено тенденцію до підвищення активності ензиму у тварин III групи і вірогідне її зниження на 16 % у тварин IV групи.

Каталазна активність у печінці тварин дослідних груп у порівнянні з контролем вірогідно не змінювалася, виявлено лише тенденцію до її зниження у тварин II і III груп і підвищення у тварин IV групи. Однак було відмічено вірогідне

підвищення активності ензиму на 28 % у печінці тварин IV дослідної групи порівняно з показниками активності тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>.

Досліджуючи вміст відновленого глутатіону у тканинах печінки тварин II групи спостерігалось вірогідне його зниження на 62 %, в той час у тварин III групи – вірогідне підвищення на 38 % і тенденція до зростання – у тварин IV групи порівняно із показниками тварин контрольної групи. Порівнюючи вміст досліджуваного продукту у печінці тварин III і IV груп із тваринами II групи, спостерігалось вірогідне його підвищення у 3,6 і 3 рази відповідно.

Глутатіонпероксидазна активність у тканинах печінки тварин II та III груп вірогідно знижувалася на 29 і 23 % відповідно, у порівнянні із тваринами контрольної групи. Активність ензиму у тварин IV групи вірогідно підвищувалася на 74 % порівняно із показниками тварин II групи та на 28 % стосовно контролю.

При дослідженні глутатіонредуктазної активності у тканинах печінки спостерігалось вірогідне її зниження на 46 % у тварин II групи та на 47 % у тварин III групи у порівнянні із показниками контрольної групи. У той же час виявлено вірогідне її зростання у тварин IV групи у 2,3 рази стосовно II групи.

Досліджуючи вміст продуктів ПОЛ у підшлунковій залозі щурів із ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату цинку, було виявлено вірогідне підвищення вмісту ГПЛ у тварин II, III і IV груп, відповідно в 2,0, 2,9, 1,6 рази, у порівнянні із тваринами контрольної групи. У порівнянні із вмістом досліджуваного субстрату у підшлунковій залозі тварин II групи спостерігалось вірогідне його підвищення на 45 % у тварин III групи і зниження на 18 % у тварин IV групи (табл. 3.14).

Вміст ТБК-активних продуктів у підшлунковій залозі вірогідно підвищувався на 86 % – у тварин II групи, на 40 % – у тварин III групи, в той час як у тварин IV групи – він знижувався на 25 % у порівнянні із тваринами контрольної групи. Вміст досліджуваного продукту у підшлунковій залозі тварин III і IV груп вірогідно знижувався на 25 і 60 % відповідно, порівняно з показниками тварин II групи.

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів з ЦД<sub>E</sub> та за дії цитрату цинку (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин			
	контрольна	дослідні		
	I	II	III	IV
Гідроперокси-ліпідів, ум. од/г протеїну	0,36±0,029	0,71±0,04***	1,03±0,006****	0,58±0,016****
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	1,52±0,09	2,83±0,02***	2,13±0,04****	1,14±0,04****
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	25,84±0,65	38,12±2,25***	29,7±1,47##	24,31±1,2##
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	5,29±0,43	4,07±0,24*	6,27±0,11****	5,56±0,13##
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	1,19±0,07	0,59±0,02***	0,74±0,02****	0,92±0,05****
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	31,31±1,5	24,5±1,21**	30,02±1,93 #	29,29±0,84##
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	0,86±0,037	0,61±0,016***	0,73±0,053	0,75±0,023****

Досліджуючи активність ензимів АОС у підшлунковій залозі тварин дослідних груп було виявлено вірогідне підвищення СОД-ної активності у тварин II групи на 48 % і III групи – на 15 %, у порівнянні із контролем (табл. 3.14). Порівнюючи показники III і IV груп із показниками II групи з ЦД<sub>E</sub>, спостерігалось вірогідне зниження СОД-ної активності на 22 і 36 % відповідно.

У результаті дослідження каталазної активності у підшлунковій залозі щурів виявлено вірогідне її зниження у тварин II групи на 23 %, однак підвищення на 19 % у тварин III групи, порівняно із тваринами контрольної групи. У підшлунковій залозі тварин III і IV груп спостерігалось вірогідне підвищення

активності досліджуваного ензиму на 54 і 37 % відповідно, у порівнянні із показниками тварин II групи.

При дослідженні вмісту відновленого глутатіону у підшлунковій залозі спостерігалось вірогідне його зниження у тварин II, III і IV груп на 50, 32 і 25 % відповідно, у порівнянні із показниками тварин I групи. Порівнюючи показники тварин III і IV груп із показниками тварин II групи із ЦД<sub>E</sub>, було виявлено вірогідне підвищення вмісту досліджуваного продукту на 25 і 56 % відповідно.

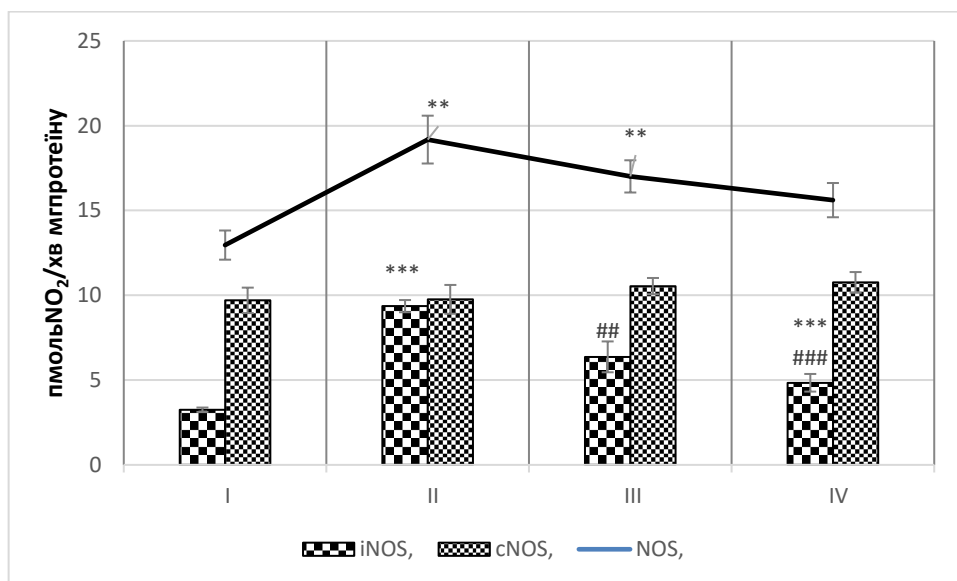
Досліджуючи ГП-ну активність у тканинах підшлункової залози тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> спостерігалось її зниження на 22 %, у порівнянні із тваринами контрольної групи. Проте при додаванні до раціону тварин цитрату цинку спостерігалось підвищення активності досліджуваного ензиму на 23 % у тварин III групи і на 20 % – у тварин IV групи, у порівнянні із тваринами II дослідної групи.

При дослідженні ГР-ної активності спостерігалось вірогідне її зниження у тварин II групи – на 29 % і IV групи на – 13 %, а також тенденція до зниження у тварин III групи, порівняно з контролем. По відношенню до ГР-ої активності у тварин II групи була виявлена тенденція до підвищення у тварин III групи і вірогідне підвищення на 23 % – у тварин IV групи.

Таким чином, з'ясовано, що за експериментального цукрового діабету у крові і тканинах зростає рівень продуктів ПОЛ та зниження активності ензимів антиоксидантного захисту. Введення до раціону щурів з ЦД<sub>E</sub> цитрату цинку, в кількостях 20 і 50 мг Zn/кг маси тіла, призводило до зростання активності досліджуваних ензимів АОС, зниження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів, що може свідчити про нормалізацію прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі за дії органічної сполуки цинку. Причому саме доза 50 мг/кг цитрату цинку проявляла найкращий позитивний вплив на стан про/антиоксидантної системи за ЦД<sub>E</sub>.

**3.2.3. NO-синтазна активність в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом за впливу цитрату цинку.** У другій серії досліджень були проведені експерименти з визначення NO-синтазної активності за експериментального діабету та впливу цитрату цинку в різних дозах. У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено що у тварин II групи з ЦД<sub>E</sub> вірогідно зростала загальна NOS активність в 1,5 раза та індукбельна NOS активність у 2,9 рази, у той час як конститутивна NOS активність не змінювалася вірогідно відносно показників тварин I групи (рис. 3.7).

Очевидно гіперглікемія, яка посилює аутоокиснення глюкози, неензиматичну глікацію протеїнів, змінює й рівень NO. Слід відзначити, що частина NO, який синтезується iNOS, може взаємодіяти з супероксидним радикалом з утворенням пероксинітриту, і викликати ендотеліальну дисфункцію. Підвищення активності iNOS також пов'язують зі збільшеним утворенням H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та впливом прозапальних цитокінів, які активують експресію mRNA iNOS [315].



**Рис.3.7. NO-синтазна активність в еритроцитах щурів з ЦД<sub>E</sub> за впливу цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг м.т.**

При додаванні щурам III дослідної групи цитрату цинку в дозі 20 мг/кг маси тіла спостерігалось вірогідне підвищення загальної NOS активності на 31 %, в той час як iNOS активність і cNOS вірогідно не змінювалася відносно показників у

тварин I групи. У тварин IV групи, яким до раціону додавали цитрату цинку в дозі 50 мг/кг, спостерігалось вірогідне підвищення на 50 % iNOS активності, в той час як загальна NOS активність і cNOS не змінювалася вірогідно у порівнянні із показниками тварин контрольної групи.

Порівнюючи показники NOS активності у тварин III і IV груп із показниками у тварин II групи спостерігалось вірогідне зниження iNOS активності на 32 і 48% відповідно, в той час як активність загальної NOS і cNOS вірогідно не змінювалися.

Зниження iNOS активності в еритроцитах щурів із ЦД<sub>E</sub> при додаванні до їх раціону цитрату цинку, очевидно зумовлено дією самого Цинку, який є важливим структурним елементом iNOS [316]. Таким чином, очевидно, Zn може впливати на активність iNOS.

**3.2.4. Вміст Цинку в організмі щурів з експериментальним діабетом та за дії цитрату цинку.** Досліджуючи вміст Цинку в організмі щурів II групи за ЦД<sub>E</sub> спостерігалось вірогідне його зниження у тканинах печінки у 2,2 раза та скелетних м'язів – у 1,1 раза у порівнянні з показниками у тварин контрольної групи (рис.3.8).

Очевидно за цукрового діабету відбувається інтенсивне виділення з сечею мікроелементів з організму, в т.ч. Цинку, що призводить до виникнення мікроелементозів. Це, відповідно, позначається на метаболізмі Цинку в організмі, який відіграє важливу роль як у секреції, так і дії інсуліну, що в подальшому може призводити до посилення метаболічних порушень при цукровому діабеті та виникненні ускладнень.

При додаванні у раціон тварин цитрату цинку в дозі 20 мг/кг м.т., спостерігалось також вірогідне зниження вмісту досліджуваного мікроелементу у печінці тварин III групи на 14 % у порівнянні із показниками контрольної групи.

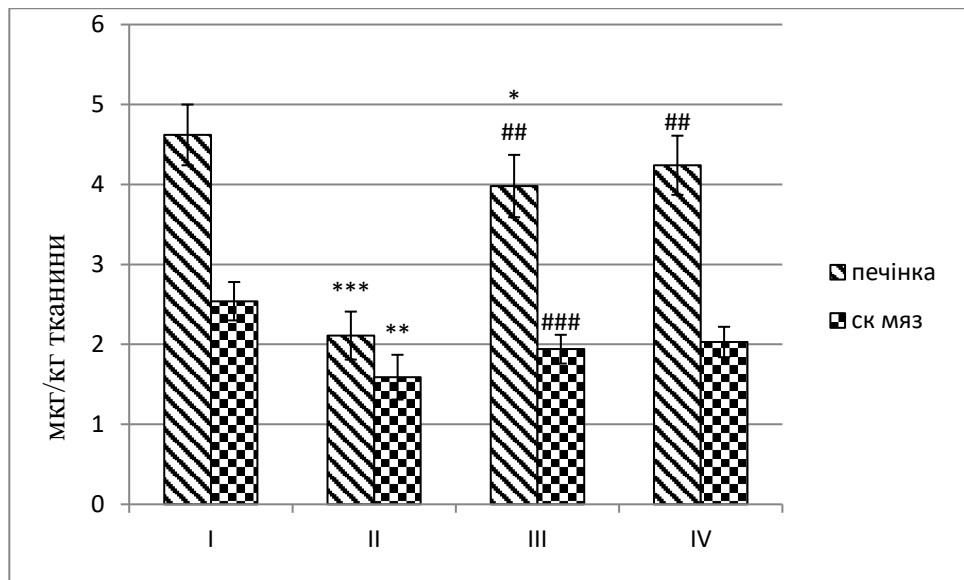


Рис.3.8. Вміст Цинку в організмі щурів з ЦД<sub>Е</sub> та за дії цитрату цинку

Порівнюючи показники вмісту досліджуваного мікроелементу у щурів III групи із показниками тварин II групи, спостерігалось вірогідне його підвищення у печінці – на 89 % та скелетних м'язах – на 22 %.

У тварин IV групи вміст Цинку вірогідно зріс у 2 рази у печінці, тоді як у скелетних м'язах спостерігалась лише тенденція до підвищення, порівняно з показниками щурами II групи.

Таким чином, введення до раціону щурів із ЦД<sub>Е</sub> цитрату цинку, призводить до підвищення вмісту досліджуваного мікроелементу у тканинах тварин.

### Висновки

1. При дослідженні показників вуглеводного обміну в організмі щурів з ЦД<sub>Е</sub> у другій серії досліджень було встановлено зростання концентрації глюкози, глікозильованого та загального гемоглобіну в крові, лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах, печінці скелетних м'язах і підшлунковій залозі та зниження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності в еритроцитах, печінці та скелетних м'язах, однак підвищення активності цього ензиму в підшлунковій залозі.
2. У тварин, яким на тлі ЦД<sub>Е</sub> до основного раціону додавали розчин цитрату цинку в дозі 50 мг Zn/кг м.т., в крові – виявлено вірогідне зниження

концентрації глюкози та відносного вмісту глікозильованого гемоглобіну, в еритроцитах, печінці та скелетних м'язах – знижувалася лактатдегідрогеназна активність та підвищувалася глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність відносно показників у тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>.

3. У щурів із ЦД<sub>E</sub> виявлено в крові зростання вмісту ГПЛ та СОД активності, однак зниження ГП- і ГР-ної активності, у скелетних м'язах – зниження СОД-, КТ-, ГП-, ГР-ної активності, у печінці – зниження вмісту ВГ, ГП- і ГР-ної активності, у підшлунковій залозі – зростання СОД-ної, однак зниження – КТ-, ГП- і ГР-ної активності та вмісту ВГ.
4. За впливу цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг в крові щурів знижувався вміст ГПЛ, однак зростала ГП-на активність, а вміст ВГ та ГР-на активність в еритроцитах зростали лише за дози цитрату цинку 20 мг/кг.
5. У скелетних м'язах за впливу цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг знижувався вміст ГПЛ, однак зростала ГР-на активність, а СОД-, КТ- і ГП-на активність зростали лише за дози 50 мг/кг.
6. У печінці за впливу цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг підвищувалася КТ-, ГП- і ГР-на активність та вміст ВГ, однак знижувався вміст ТБК- активних продуктів і СОД активність – лише за дози 50 мг/кг.
7. У підшлунковій залозі за обох досліджуваних доз цитрату цинку знижувалася СОД активність і вміст ТБК-активних продуктів, а за дози 50 мг/кг – знижувався вміст ГПЛ, однак зростав вміст ВГ та КТ-, ГП- і ГР активність.
8. В еритроцитах тварин II групи з ЦД<sub>E</sub> вірогідно зростала загальна NOS активність в 1,5 раза та індущибельна NOS активність у 2,9 рази, у той час як конститутивна NOS активність не змінювалася. За впливу цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг/кг спостерігалася вірогідне зниження iNOS активності на



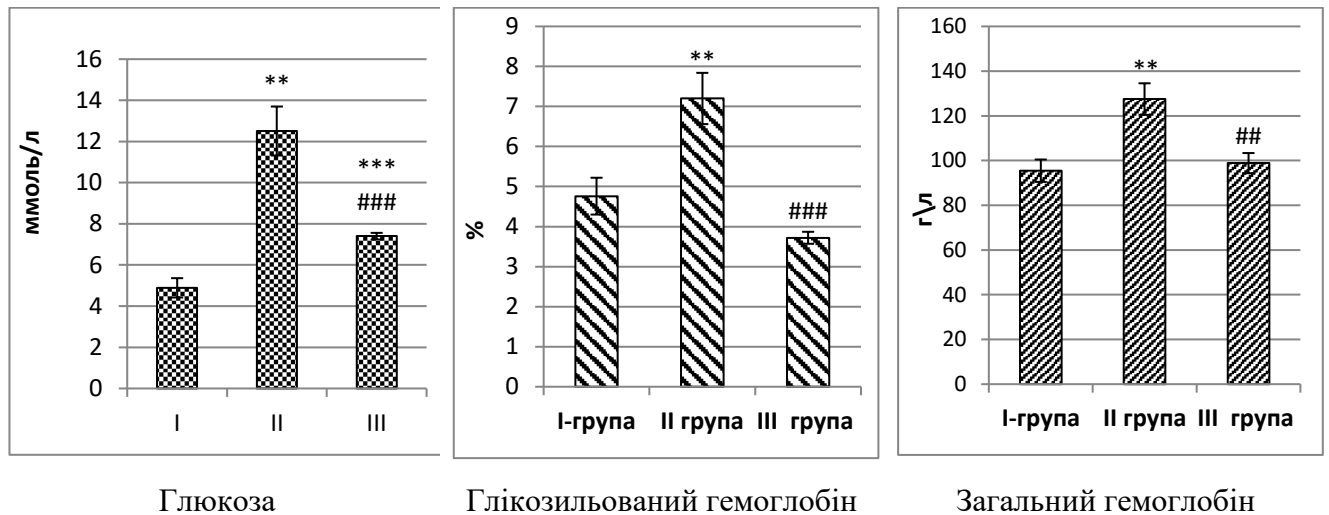
32 і 48 % відповідно, в той час як активність загальної NOS і cNOS вірогідно не змінювалися порівняно з показниками у тварин II групи з ЦД<sub>E</sub>.

9. Досліджуючи вміст Цинку в організмі щурів II групи за ЦД<sub>E</sub> спостерігалось вірогідне його зниження у тканинах печінки у 2,2 раза та скелетних м'язів – у 1,1 раза у порівнянні з показниками у тварин контрольної групи. Введення до раціону щурів із ЦД<sub>E</sub> цитрату цинку в різних дозах призводить до підвищення вмісту досліджуваного мікроелементу у тканинах тварин. Результати опубліковані у працях [318-323].

**3.3. Сумісний вплив цитратів хрому (25 мкг/кг м.т.) і цинку (50 мг/кг м.т.) на біохімічні процеси в організмі щурів із стрептозотоциновим діабетом.** У першій та другій серії досліджень було встановлені оптимальні дози цитрату хрому – 25 мкг/кг маси тіла (із обраних нами для досліджень – 10 і 25 мкг /кг маси тіла) та цитрату цинку – 50 мг/кг маси тіла (із обраних нами для досліджень – 20 і 50 мг /кг маси тіла), які здійснювали позитивний ефект на окремі ланки вуглеводного обміну, стан процесів пероксидного окиснення ліпідів, активність ензимів антиоксидантної системи та NO-синтаз в організмі щурів із ЦД<sub>E</sub>. У третій серії досліджень були проведені дослідження сумісної дії цитратів хрому і цинку в оптимальних дозах на біохімічні процеси в крові і тканинах щурів із стрептозоточин індукованим діабетом.

**3.3.1. Дослідження сумісного впливу цитратів хрому та цинку на показники вуглеводного обміну в організмі тварин з експериментально індукованим діабетом.** Досліджуючи концентрацію глюкози в третій серії досліджень у тварин II дослідної групи із ЦД<sub>E</sub> виявлено вірогідне її підвищення у 2,5 рази по відношенню до показників у тварин контрольної групи (рис 3.9).

За сумісної дії цитратів хрому і цинку у тварин III дослідної групи спостерігалось вірогідне підвищення рівня глюкози в 1,5 рази, порівняно до контролю, однак зниження 1,5 рази у порівнянні із показниками тварин II дослідної групи із ЦД<sub>E</sub>.



**Рис. 3.9. Концентрація глюкози, вміст глікозильованого гемоглобіну та загального гемоглобіну в крові щурів з ЦД<sub>Е</sub> і за сумісної дії цитратів хрому і цинку.**

Аналізуючи рівень глікозильованого гемоглобіну і загального гемоглобіну, виявлено їх вірогідне підвищення у тварин II групи ЦД<sub>Е</sub> на 51 і 34 % відповідно, і тенденцію до зниження у тварин III групи, в порівнянні із тваринами I групи. При сумісному додаванні до раціону тварин III групи цитратів хрому і цинку вірогідно знижувався рівень глікозильованого гемоглобіну – на 48 %, загального гемоглобіну – на 23% у порівнянні із тваринами II дослідної групи з ЦД<sub>Е</sub> (рис. 3.9).

Таким чином, сумісний вплив цитратів мікроелементів проявляє гіпоглікемічну дію, знижуючи рівень глюкози і глікозильованого гемоглобіну в крові щурів III групи, що очевидно має позитивний ефект в організмі із цукровим діабетом. А зниження концентрації загального гемоглобіну у тварин III групи не створює негативного ефекту на організм, оскільки його показники відповідають рівню у тварин контрольної групи.

Глюкоза, концентрація якої знижується за впливу досліджуваних цитратів мікроелементів, здатна надходити у клітини, де вона метаболізується різними шляхами. Так, досліджуючи лактатдегідрогеназну активність у щурів II групи із ЦД<sub>Е</sub> в третій серії досліджень було виявлено вірогідне підвищення активності даного ензиму на 32 % – в еритроцитах, на 36% – у скелетних м'язах, на 19 % – у

підшлунковій залозі та тенденція до підвищення – у печінці, порівняно із тваринами I групи (табл. 3.15)

Таблиця 3.15

**Лактатдегідрогеназна активність в еритроцитах та тканинах щурів із ЦД<sub>Е</sub> за сумісної дії цитратів хрому та цинку, нмоль/хв. •мг протеїну (M±m; n=7)**

Досліджувані клітини та тканини	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
		I	II
еритроцити	36,49±2,8	48,24±1,68**	30,5±0,85****#
печінка	1,58±0,40	2,16±0,14	1,90±0,06
скелетні м'язи	3,14±0,12	4,28±0,17***	3,81±0,11****#
підшлункова залоза	5,13±0,18	6,12±0,34**	5,48±0,28

У тварин III дослідної групи, яким до основного раціону із водою сумісно додавали цитрати хрому і цинку, порівняно до показників у тварин контрольної групи, спостерігалось вірогідне підвищення активності ензиму у тканинах скелетних м'язів на 21 % та вірогідне зниження активності в еритроцитах на 16 %. При порівнянні лактатдегідрогеназної активності у тварин III групи стосовно II групи із ЦД<sub>Е</sub>, спостерігалось вірогідне зниження активності ензиму в еритроцитах на 37 % і тканинах скелетних м'язів на 11 %, а також тенденція до зниження – у тканинах печінки і підшлункової залози.

Варто вказати, що на тлі підвищення ЛДГ-ної активності у крові щурів II групи з ЦД<sub>Е</sub> було виявлено вірогідне підвищення рівня лактату на 30 %, та вірогідне зниження рівня пірувату на 23 % у порівнянні із тваринами I групи (табл. 3.16). При сумісному додаванні до раціону тварин цитратів хрому і цинку, у крові спостерігалось вірогідне зниження рівня лактату на 30 % і тенденція до підвищення вмісту пірувату у порівнянні із показниками тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub>.

**Вміст лактату і пірувату в крові щурів із ЦД<sub>E</sub> та за сумісної дії цитратів хрому і цинку, мМ, (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
Лактат	3,34±0,25	4,34±0,32**	3,04±0,31 <sup>##</sup>
Піруват	0,44±0,016	0,34±0,02**	0,43±0,02

Досліджуючи Г-6-ФДГ–ну активність, що характеризує інтенсивність ПФШ, у тварин II групи з ЦД<sub>E</sub> було встановлено її вірогідне зниження в еритроцитах – на 45 %, печінці – на 64 %, скелетних м'язах – на 34 %, в той же час у підшлунковій залозі – активність ензиму вірогідно підвищувалася на 55 % у порівнянні із показниками у тварин I групи (табл. 3.17).

При порівнянні активності даного ензиму у тварин III груп із показниками у тварин II групи спостерігалось вірогідне її підвищення в еритроцитах на 55 %, тканинах печінки – у 2,9 рази та скелетних м'язів – на 32 %, в той час як у підшлунковій залозі відмічалось вірогідне зниження активності ензиму на 23 %.

**Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в еритроцитах та тканинах щурів за сумісної дії цитратів хрому та цинку, нмоль/хв. • мг протеїну (M±m; n=7)**

Досліджувані клітини та тканини	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
еритроцити	6,83±0,44	3,76±0,22***	5,82±0,68 <sup>##</sup>
печінка	2,92±0,058	1,05±0,142***	3,09±0,11 <sup>###</sup>
скелетні м'язи	0,802±0,056	0,523±0,024***	0,695±0,038 <sup>##</sup>
підшлункова залоза	3,28±0,18	5,08±0,41***	3,91±0,24 <sup>##</sup>

Отже, за сумісної дії цитратів хрому і цинку у крові щурів знижувався вміст глюкози, глікозильованого гемоглобіну, загального гемоглобіну, в еритроцитах і тканинах – знижувалася ЛДГ-на активність, в той час як Г-6-ФДГ-на активність – зростала, за виключенням підшлункової залози, у порівнянні із показниками у тварин із ЦД<sub>E</sub>, які не споживали розчин цитратів мікроелементів.

**3.3.2. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів АОС в організмі щурів з експериментальним діабетом та при сумісній дії цитратів хрому і цинку.** При дослідженні стану прооксидантної системи у третій серії досліджень було виявлено вірогідне підвищення вмісту ГПЛ на 74 % у крові тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> у порівнянні із аналогічними показниками тварин контрольної групи. Подібні результати отримані й у першій та другій серії досліджень. Це можна пояснити тим, що ГПЛ, як початкові продукти ПОЛ, утворюються в ранні терміни ураження цукрового діабету. Таким чином, гідропероксиди ліпідів у крові можуть давати інформацію щодо прогнозу виникнення діабету, при якому вторинні розлади інколи вже є летальними.

*Таблиця 3.18*

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові щурів з ЦД<sub>E</sub> та за сумісної дії цитратів цинку і хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,503±0,015	0,88±0,013 <sup>***</sup>	0,55±0,027 <sup>###</sup>
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	3,62±0,11	3,85±0,13	3,73±0,07

За умов сумісного додавання у раціон тварин III групи цитратів хрому і цинку відбувалося вірогідне зниження вмісту ГПЛ на 38% у порівнянні із показниками тварин II групи (табл. 3.18). Це свідить про позитивний вплив

сумісного введення досліджуваних сполук на процеси ліпопероксидації та запобігання виникнення розладів, які відбуваються за діабету.

При дослідженні вмісту ТБК-активних продуктів не спостерігалось вірогідних змін у дослідних групах стосовно контролю, лише тенденція до підвищення їх вмісту у тварин II групи у порівнянні з тваринами контролю та тенденція до зниження у тварин III групи порівняно з тваринами II групи з ЦД<sub>E</sub>.

Аналізуючи показники каталазної і глутатіонредуктазної активності за сумісної дії цитратів хрому і цинку в еритроцитах щурів, не спостерігалось вірогідних змін у тварин дослідних груп (табл. 3.19).

Супероксиддисмутазна активність вірогідно підвищувалася на 17 % у тварин II групи з ЦД<sub>E</sub> у порівнянні із показниками тварин I групи. При додаванні у раціон тварин цитратів хрому і цинку активність даного ензиму в еритроцитах щурів вірогідно знижувалася на 18 % у порівнянні із показниками тварин II групи.

Аналізуючи показники відновленого глутатіону спостерігалася тенденція до зниження його вмісту у тварин II групи у порівнянні із тваринами контрольної групи. В той же час при додаванні в раціон тварин III групи цитратів хрому і цинку спостерігалось вірогідне підвищення на 21 % вмісту досліджуваного субстрату в крові у порівнянні з його рівнем у тварин II групи із ЦД<sub>E</sub>.

Таблиця 3.19

**Активність ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах щурів із ЦД<sub>E</sub> та за сумісної дії цитратів цинку і хрому (M±m, n=7).**

Досліджувані показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	22,74±0,70	26,53±0,89**	23,15±0,86##
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	19,55±0,91	18,38±0,77	20,36±1,01
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,78±0,029	0,69±0,058	0,87±0,042##
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	22,15±0,87	17,38±0,75**	21,93±0,69###
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	1,41±0,11	1,27±0,09	1,39±0,12

Досліджуючи ГП-ну активність, спостерігалось її вірогідне зниження на 22 % у тварин II дослідної групи із ЦД<sub>E</sub> у порівнянні із контролем. Зниження антиоксидантної активності глутатіонпероксидази за ЦД<sub>E</sub> може зумовлювати підвищення концентрації гідропероксидів ліпідів, що було й виявлено у наших дослідженнях. Виникає дисбаланс між утворенням та руйнуванням вільних радикалів, через неспроможність функціонування антиоксидантної системи за ЦД<sub>E</sub>. За сумісної дії цитратів хрому і цинку у тварин III групи спостерігалось вірогідне зростання активності ензиму на 26 % стосовно II групи. Очевидно цитрати досліджуваних мікроелементів здатні захищати клітини від згубної дії вільних радикалів, шляхом активації глутатіонпероксидази.

Отримані результати свідчать про нормалізацію процесів ПОЛ в крові та підвищення активності ензимів антиоксидантного захисту за сумісного впливу цитратів хрому і цинку.

Досліджуючи стан про/антиоксидантної системи у скелетних м'язах щурів за сумісної дії цитратів мікроелементів було встановлено, що у тварин II групи за ЦД<sub>E</sub> спостерігалось вірогідне підвищення в 2,0 рази рівня ГПЛ та ТБК активних продуктів – в 1,9 раза у порівнянні із показниками тварин I групи. При додаванні тваринам III дослідної групи цитратів хрому і цинку, спостерігалась тенденція до підвищення вмісту продуктів ПОЛ стосовно показників у тварин контрольної групи та вірогідне зниження вмісту ГПЛ на 39 % і ТБК-активних продуктів – на 44% стосовно показників у тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> (тал. 3.20).

Досліджуючи активність ензимі АОС у тканинах скелетних м'язів тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> виявлено вірогідне зниження активності СОД на 30 %, КТ – на 30 %, ГП – на 20 %, ГР – на 41 % і тенденція до зниження рівня ВГ у порівнянні із показниками тварин I групи.

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у скелетних м'язах щурів з ЦД<sub>Е</sub> та за сумісної дії цитратів цинку і хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	0,19±0,049	0,38±0,037**	0,23±0,054 <sup>#</sup>
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	1,53±0,18	2,98±0,27***	1,67±0,18 <sup>##</sup>
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	61,28±2,15	52,38±1,83**	57,84±1,81 <sup>##</sup>
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	17,65±1,92	12,27±0,39*	15,11±1,08 <sup>#</sup>
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,32±0,012	0,27±0,021	0,31±0,019
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	17,3±1,19	13,8±0,99*	14,11±0,81*
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	0,37±0,041	0,22±0,028*	0,39±0,061 <sup>#</sup>

При сумісному додаванні до раціону тварин III групи цитратів хрому і цинку у скелетних м'язах спостерігалось вірогідне зниження активності ГП на 18% у порівнянні із тваринами контрольної групи, однак тенденція до її підвищення стосовно II групи із ЦД<sub>Е</sub>. Порівнюючи інші показники АОС у м'язах тварин III дослідної групи із II групою виявлено вірогідне підвищення активності СОД на 10 %, КТ – на 23 %, ГР – на 77 % та тенденція до підвищення вмісту ВГ.

Сталість концентрації глюкози в крові забезпечує печінка. У результаті досліджень тканин печінки тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub> встановлено вірогідне підвищення в ній вмісту ГПЛ на 40 % і ТБК-активних продуктів – на 51 % у порівнянні із показниками тварин контрольної групи.



**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантної системи у печінці щурів з ЦД<sub>E</sub> та за сумісної дії цитратів цинку і хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
Гідропероксида ліпідів, ум. од/г протеїну	0,15±0,018	0,21±0,012**	0,14±0,01##
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	2,57±0,15	3,89±0,31**	2,92±0,19#
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	38,15±1,11	40,67±1,25	34,22±1,07***##
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	8,53±0,37	7,61±0,48	8,82±0,17##
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	3,89±0,31	1,86±0,28***	4,07±0,35###
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	9,62±0,45	7,76±0,28**	10,37±0,39###
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	1,35±0,12	0,88±0,13*	1,31±0,11#

Досліджуючи активність ензимів АОС в тканинах печінки у тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> було виявлено вірогідне зниження активності ГП – на 19 %, ГР – на 33 %, вмісту ВГ – на 52 % та тенденцію до зниження активності КТ і підвищення СОД у порівнянні із тваринами контрольної групи (табл. 3.21).

У печінці тварин III групи стосовно контрольної групи спостерігалось вірогідне зниження СОД-ної активності на 10 %. Порівняно до показників у печінці тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> за сумісного впливу цитратів мікроелементів спостерігалось вірогідне зниження вмісту ГПЛ – на 33 %, ТБК – активних продуктів – на 25 % та СОД-ної активності – на 16 %, однак вірогідне підвищення активності КТ – на 16 %, ГП – на 34 %, ГР – на 49 % і вмісту ВГ – на 119 % (табл 3.21).

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів, відновленого глутатіону та активність ензимів антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів з ЦД<sub>E</sub> та за сумісної дії цитратів цинку і хрому (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
Гідропероксида ліпідів, ум. од/г протеїну	0,41±0,024	0,70±0,05 <sup>***</sup>	0,45±0,019 <sup>###</sup>
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	1,72±0,028	2,58±0,021 <sup>***</sup>	1,60±0,012 <sup>**###</sup>
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	16,87±0,89	28,25±2,28 <sup>***</sup>	20,19±0,71 <sup>**#</sup>
Каталаза, мкмоль/хв × мг протеїну	5,18±0,42	4,02±0,31 <sup>*</sup>	4,86±0,15 <sup>#</sup>
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	1,11±0,06	0,61±0,03 <sup>***</sup>	1,06±0,05 <sup>###</sup>
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв × мг протеїну	30,63±1,61	23,45±1,81 <sup>*</sup>	30,14±2,25 <sup>#</sup>
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв × мг протеїну	0,82±0,033	0,64±0,019 <sup>***</sup>	0,78±0,036 <sup>##</sup>

У дослідженні встановлено, що у підшлунковій залозі тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> вірогідно підвищився вміст ГПЛ на 71 % і ТБК-активних продуктів – на 50 % у порівнянні із тваринами контрольної групи (табл. 3.22). Досліджуючи активність ензимів АОС у підшлунковій залозі тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> було виявлено вірогідне зниження активності КТ на 22 %, ГП – на 23 %, ГР – на 22 %, вмісту ВГ – на 45 %, в той час активність СОД підвищувалася на 67 % у порівнянні із показниками тварин контрольної групи.

В той час, як за умов сумісного застосування цитратів хрому і цинку у підшлунковій залозі тварин III групи спостерігалось вірогідне зниження ТБК-активних продуктів на 7 % та вірогідне підвищення СОД-ної активності на 20 % порівняно із тваринами контрольної групи.

Аналізуючи вміст продуктів ПОЛ та активність ензимів АОС у залозі тварин III дослідної групи стосовно II групи встановлено вірогідне зниження вмісту ГПЛ

на 36 %, ТБК–активних продуктів – на 38 % і СОД-ної активності – на 29 %, однак вірогідне підвищення активності КТ – на 21 %, ГП – на 29 %, ГР – на 22 % та вмісту ВГ – на 42 % (табл. 3.22).

Загалом зниження активності ензимів АОС як у крові, так і в досліджуваних тканинах тварин II групи за ЦД<sub>Е</sub>, очевидно, зумовлене виснаженням їх запасів, що витрачаються на нейтралізацію вільних радикалів. А сумісне застосування цитратів цинку і хрому призводить до підвищення активності ензимів АОС стосовно рівня у тварин з ЦД<sub>Е</sub>.

В той час як зростання СОД активності в еритроцитах, печінці та підшлункові залозі тварин із ЦД<sub>Е</sub>, очевидно, зумовлено накопиченням супероксидного радикалу у клітинах цих тканин та спроможність ензиму нівелювати їх дію. Сумісне застосування цитратів цинку і хрому зумовлює нормалізацію активності СОД у тканинах тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

**3.3.3. Активність NO-синтаз в еритроцитах тварин з експериментально індукованим діабетом та за сумісного впливу цитратів хрому і цинку.** У третій серії досліджень за сумісного додавання до раціону щурів розчину цитратів хрому і цинку загальна NO-синтазна активність в еритроцитах тварин II групи з ЦД<sub>Е</sub> вірогідно підвищувалася на 30%, а індукбельна NO-синтазна активність – у 2,9 рази, в той час як конститутивна NO-синтазна активність мала тенденцію до зниження у порівнянні із тваринами контрольної групи. У крові тварин III групи, до раціону яких сумісно додавали цитрати хрому і цинку, спостерігалася тенденція до підвищення активності NO-синтаз у порівнянні із тваринами контрольної групи, однак вірогідне зниження загальної NO-синтазної активності на 30% та індукбельної NO-синтазної активності – на 55% порівняно із тваринами II групи з ЦД<sub>Е</sub> (табл. 3.23).

**Активність NO-синтаз в еритроцитах щурів із ЦД<sub>E</sub> та за сумісної дії цитратів цинку і хрому, пмоль NO<sub>2</sub> / хв × мг протеїну (M±m, n=7).**

Показники	Групи тварин		
	контрольна	дослідні	
	I	II	III
NOS	12,55±0,55	18,96±1,28**	13,35±0,65###
iNOS	3,15±0,25	9,13±0,92***	4,09±0,37###
cNOS	10,12±0,64	9,76±0,71	10,23±0,38

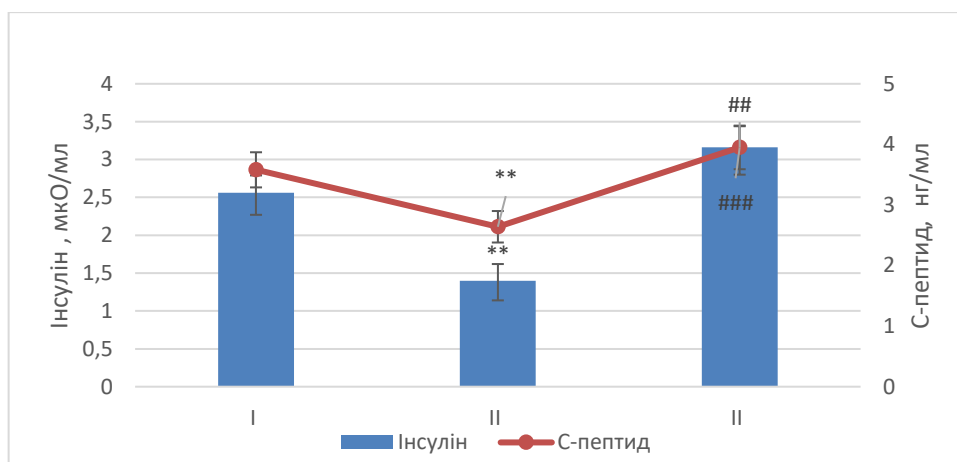
Отже, сумісне застосування цитратів хрому і цинку зумовлює зниження активності загальної та індукцибельної NOS, порівняно із підвищеним рівнем у тварин ЦД<sub>E</sub>. Очевидно, як Cr, так і Zn можуть пригнічувати активність iNOS внаслідок безпосередньої дії на кофактори цього ензиму. Крім цього, ці метали можуть гальмувати синтез NO за допомогою регулювання захисних механізмів або індукції гіперчутливості [303]

Таким чином, введення до раціону щурів із цукровим діабетом цитратів хрому і цинку призводить до нормалізації NOS системи в еритроцитах та обґрунтовує можливість корекції її порушень за умов даної патології. Отримані результати можуть лягти в основу з'ясування ролі NO-залежних сигнальних шляхів у регуляції функціонального стану клітин крові при цукровому діабеті.

**3.3.4. Вміст інсуліну і С-пептиду в крові щурів з експериментальним діабетом та за сумісної дії цитратів цинку і хрому.** Певну роль у діагностиці цукрового діабету має визначення рівня інсуліну та С-пептиду. Визначення імунореактивного інсуліну дає змогу зробити висновок про секрецію ендогенного інсуліну. Його доцільно робити тільки тим хворим, які не отримують і ніколи не отримували препаратів інсуліну, оскільки до екзогенного інсуліну утворюються

антитіла, що може впливати на вірогідність даного показника. Визначення С-пептиду дозволяє оцінити функціональний стан інкреторного апарату підшлункової залози, у тому числі й на тлі інсуліно-терапії. С-пептид є найточнішим показником, який використовують для діагностики цукрового діабету.

У процесі виконання роботи встановлено, що за умов стрептозотоніндукованого діабету у крові тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> вірогідно знижувалася як концентрація інсуліну на 45 %, так і С-пептиду – на 26 % у порівнянні із показниками тварин контрольної групи. При сумісному додаванні у раціон тварин цитратів хрому і цинку у тварин III групи спостерігалася тенденція до підвищення концентрації інсуліну і С-пептиду, у порівнянні із тваринами контрольної групи, та вірогідне підвищення їх вмісту, відповідно в 2,3 і 1,5 рази, порівняно із показниками тварин II групи із ЦД<sub>E</sub>.



**Рис. 3.10. Концентрація інсуліну і С-пептиду у сироватці крові щурів з експериментальним діабетом та за сумісної дії цитратів цинку і хрому (M±m, n=7).**

Секреція С-пептиду у хворих на ЦД залежить від цілого ряду факторів, у тому числі, від компенсації ЦД і глюкозотоксичності, стану інсулінорезистентності в організмі, тривалості захворювання, віку хворого, тактики лікування хворого, деяких агресивних факторів навколишнього середовища, наявності супутніх захворювань і т.д [324]. Тому зниження рівня С-

пептиду, як і інсуліну в крові щурів II групи із ЦД<sub>E</sub> свідчить про зменшення їх секреції, внаслідок пригнічення функціонального стану  $\beta$ -клітин підшлункової залози. Зростання концентрації досліджуваних показників за дії цитратів хрому і цинку може свідчить про нормалізацію їх рівня в крові внаслідок відновлення пошкоджених стрептозотоцином функцій  $\beta$ -клітин, або інтенсифікації їх секреції непошкодженими клітинами. Таким чином, сумісна дія цитратів мікроелементів призводить до покращення функціонального стану підшлункової залози за експериментального цукрового діабету.

### 3.3.5. Вміст Хрому і Цинку в організмі щурів з експериментальним діабетом та за сумісної дії цитратів хрому та цинку.

При дослідженні сумісного впливу цитратів хрому і цинку на вміст мікроелементів у тканинах щурів із експериментальним діабетом було виявлено, що в печінці щурів II групи із ЦД<sub>E</sub> вірогідно знижувався вміст Хрому в 2,6 раза та вміст Цинку – в 2,3 раза (рис. 3.11). Порівнюючи вміст досліджуваних мікроелементів у печінці тварин III дослідної групи із показниками II групи, спостерігалось вірогідне підвищення вмісту Хрому у 3,6 раза та Цинку – в 2,2 раза.

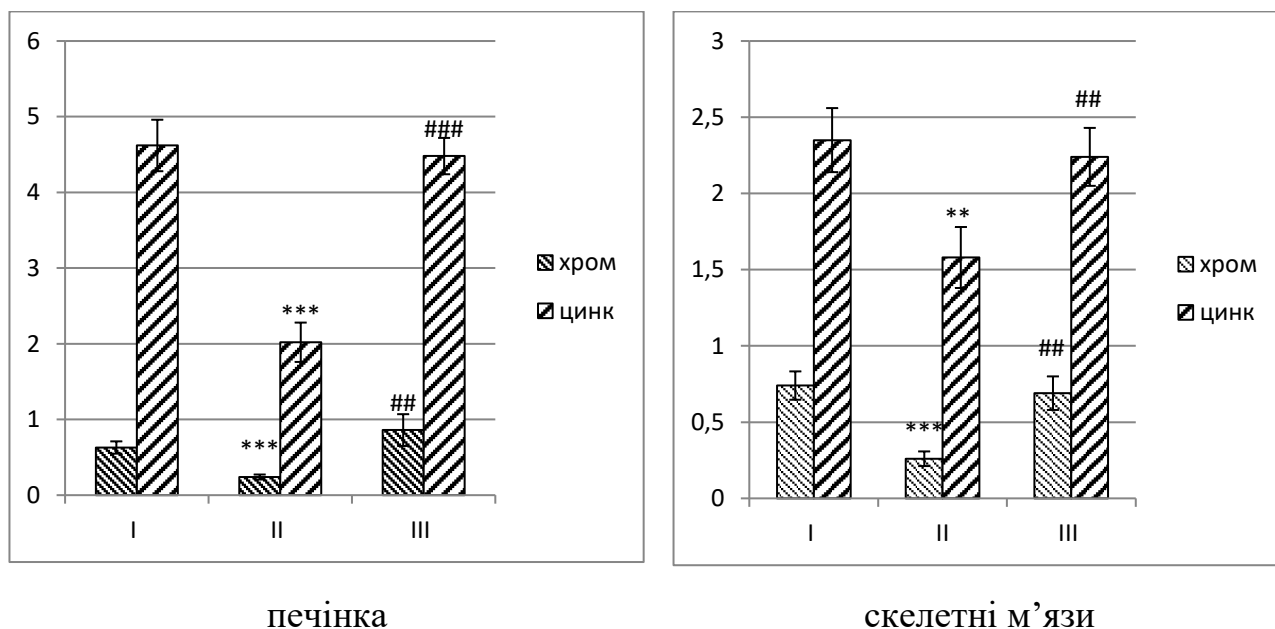


Рис 3.11. Вміст Хрому і Цинку в печінці та скелетних м'язах щурів з експериментальним діабетом та за сумісної дії цитратів хрому та цинку, мкг/кг тканини

Досліджуючи сумісний вплив цитратів хрому і цинку у тканинах скелетних м'язів щурів виявлено вірогідне зниження вмісту Хрому у 2,8 раза і вмісту Цинку – в 3,3 раза у тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub> у порівнянні із показниками тварин контрольної групи (рис. 3.11). Порівнюючи вміст досліджуваних мікроелементів у скелетних м'язах тварин III дослідної групи із показниками II групи, спостерігалось вірогідне підвищення вмісту Хрому у 2,6 раза і Цинку – в 1,5 раза.

### Висновки

1. За сумісної дії оптимальних доз цитрату хрому (25 мкг/кг маси тіла) та цитрату цинку (50 мг/кг маси тіла) у крові тварин спостерігалось вірогідне зниження концентрації глюкози в 1,5 рази, рівня глікозильованого гемоглобіну – на 48 % та загального гемоглобіну – на 23 % у порівнянні із показниками тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub>.
2. При сумісному додаванні до раціону тварин цитратів хрому і цинку у тварин III групи стосовно II групи із ЦД<sub>Е</sub>, спостерігалось вірогідне зниження на 30% рівня лактату в крові, зменшення лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах на 37 % і тканинах скелетних м'язів – на 11 %, однак вірогідне підвищення Г-6-ФДГ-ної активності в еритроцитах на 55%, тканинах печінки – у 2,9 рази та скелетних м'язів – на 32 %, в той час як у підшлунковій залозі – вірогідне зниження активності ензиму на 23 %.
3. За умов сумісного додавання у раціон щурів III групи цитратів хрому і цинку в плазмі їх крові вірогідно знижувався вміст ГПЛ на 38%, в еритроцитах – вірогідно знижувалася на 18 % СОД-на активність, підвищувався вміст відновленого глутатіону на 21 %, зростала ГП-на активність на 26 % у порівнянні з показниками у тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub>.
4. У скелетних м'язах щурів III групи за сумісної дії цитратів хрому і цинку вірогідно знижувався вміст ГПЛ на 39 % і ТБК-активних продуктів – на 44 %, підвищувалися активності СОД – на 10 %, КТ – на 23 %, ГР – на 77 %, стосовно показників у тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub>.
5. У печінці тварин за сумісного впливу цитратів мікроелементів, порівняно до показників II групи із ЦД<sub>Е</sub>, спостерігалось вірогідне зниження вмісту ГПЛ – на

33 %, ТБК-активних продуктів – на 25 % та СОД-ної активності – на 16 %, однак вірогідне підвищення активності КТ – на 16 %, ГП – на 34 %, ГР – на 49 % і вмісту ВГ – на 119 %.

6. У підшлунковій залозі тварин III дослідної групи, стосовно II групи, встановлено вірогідне зниження вмісту ГПЛ на 36 %, ТБК-активних продуктів – на 38 % і СОД-ної активності – на 29 %, однак вірогідне підвищення активності КТ – на 21 %, ГП – на 29 %, ГР – на 22 % та вмісту ВГ – на 42 %.

7. У крові тварин, яким до раціону сумісно додавали цитрати хрому і цинку, спостерігалось вірогідне зниження загальної NO-синтазної активності на 30% та індукцибельної NO-синтазної активності – на 55 % порівняно із тваринами II групи з ЦД<sub>E</sub>.

8. За умов стрептозотоцин індукованого діабету у крові тварин II групи із ЦД<sub>E</sub> вірогідно знижувалася концентрація інсуліну на 45 % і С-пептиду – на 26 % у порівнянні із показниками тварин контрольної групи. При сумісному додаванні у раціон тварин цитратів хрому і цинку спостерігалось вірогідне підвищення вмісту інсуліну в 2,3 і С-пептиду – в 1,5 рази, порівняно із показниками тварин II групи із ЦД<sub>E</sub>.

9. Порівнюючи вміст досліджуваних мікроелементів у тварин III дослідної групи із показниками тварин II групи із ЦД<sub>E</sub>, спостерігалось вірогідне підвищення вмісту Хрому і Цинку у печінці, відповідно в 3,6 і 2,2 рази, у скелетних м'язах – в 2,6 і 1,5 рази.

Результати опубліковані у працях [325-327].



## РОЗДІЛ 4.

### АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цукровий діабет – досить складне ендокринне захворювання, що супроводжується порушеннями функціонування різних систем організму. На виникнення і прогресування діабету та його ускладнень впливають різні фактори, включаючи ожиріння, інсулінорезистентність, гіперглікемія та гіперліпідемія [328].

Патологічне підвищення концентрації глюкози в крові може бути пов'язане як з недостатнім синтезом і вивільненням інсуліну  $\beta$ -клітинами острівців Лангенганса, так і з певними змінами на рівні гормоно-рецепторної взаємодії з клітинами інсуліночутливих тканин (печінка, м'язова та жирова тканини). Згадані ускладнення можуть призводити до певного дисбалансу на внутрішньоклітинному метаболічному рівні тканин-мішеней гормону, зокрема порушення процесів утилізації глюкози, гліколізу та глікогенезу [329].

В основі складової патогенезу цукрового діабету та його специфічних і неспецифічних ускладнень лежить оксидативний стрес [57,330]. Джерелами інтенсивного утворення вільних радикалів за умов ЦД є неензиматичні, ензиматичні та мітохондріальні шляхи. Неензиматичне джерело активних форм Оксигену пов'язане, в першу чергу, з гіперглікемією. Так, за умов високих концентрацій глюкоза піддається аутоокисненню та генерує вельми агресивний радикал  $\cdot\text{OH}$  [331], крім того, процес неензиматичного глікозилювання протеїнів та взаємодія глікозильованих продуктів із специфічними рецепторами супроводжуються утворенням АФО на певних стадіях [332,333]. Одночасно, гіперглікемія викликає в інсулін-незалежних тканинах активацію поліолового шляху перетворення глюкози, що призводить до підвищення продукції  $\text{O}^{\cdot-}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  та зниження рівня відновленого глутатіону внаслідок недостатньої кількості НАД(Ф)Н [333,334]. Крім цього, значне підвищення в крові рівня вільних жирних кислот, у результаті зняття гальмівного впливу інсуліну на ліполіз, призводить до

збільшення кількості субстрату для ліпідної пероксидації [57,335]. Ензиматичні джерела АФО за умов цукрового діабету, головним чином, включають NO-синтази, НАДФН-оксидази та ксантинооксидазу [336,337]. Однак найвагомим ініціаторним джерелом вільних радикалів за умов ЦД є мітохондрії, які під впливом надлишку субстрату (глюкоза і вільні жирні кислоти) для окиснювального фосфорилування генерують  $O_2^{\cdot-}$  у кількості, яку не здатні інактивувати захисні системи організму [338].

З метою оцінки оксидативного стресу, який виникає за цукрового діабету та інтенсивності протікання вуглеводного обміну в організмі лабораторних тварин, а також з метою зменшення негативних наслідків метаболічних порушень, які виникають при гіперглікемії, шляхом введення до раціону цитратів мікроелементів проводили дані дослідження.

Експериментальний цукровий діабет у лабораторних щурів викликали шляхом внутрішньоочеревинного введення найпотужнішої діабетогенної хімічної речовини стрептозотоцину [328]. Він використовується як цитотоксичний аналог глюкози, який, як правило, накопичуються в бета-клітинах підшлункової залози через транспортер глюкози 2 (GLUT2) [339]. У стрептозотоцині, як аналогу нітрососечовини, присутній зв'язок між N-метил-N-нітрососечовиною і 2 вуглецем гексози. Взагалі механізм токсичної дії стрептозотоцину залежить від ДНК алкілюючої активності метил-нітрососечовини. Перенесення метильної групи від стрептозотоцину до молекули ДНК спричиняє її пошкодження та призводить до фрагментації [339].

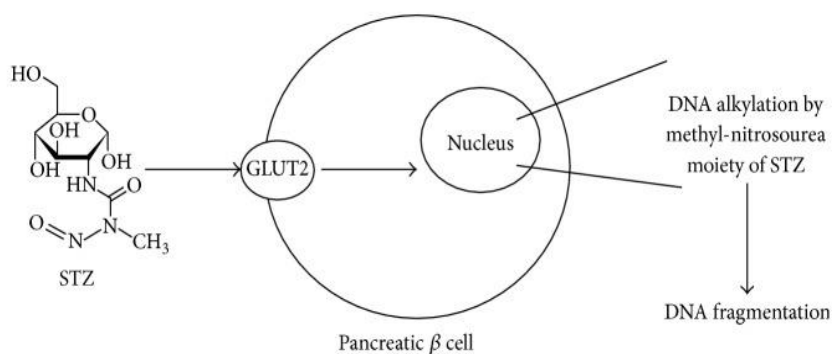


Рис.4.1. Механізм дії стрептозотоцину в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози[328].

Таким чином, за введення стрептозотоцину, який селективно вражає  $\beta$ -клітини острівців підшлункової залози, виникав експериментальний діабет, що супроводжувався недостатньою секрецією гормону. Це підтверджувалося результатами наших досліджень, у яких спостерігалось вірогідне зниження рівня інсуліну та С-пептиду в крові щурів із ЦД<sub>Е</sub>. Концентрація С-пептиду в крові відповідає концентрації ендogenousного інсуліну. Як правило, вона знижена при ЦД 1-го типу та збільшена у початковій фазі ЦД 2-го типу, коли домінує інсулінорезистентність і зростає секреція інсуліну, однак надалі – знижується після вичерпання секреторних резервів  $\beta$ -клітин.

Між кількістю інсуліну та С-пептиду існує прямий взаємозв'язок. На відміну від життєво важливого гормону, який так потрібен для перетворення глюкози, С-пептид ніяк не пов'язаний з рецепторами печінки, а в кровотоці він знаходиться в тій же концентрації, що й у портальній вені. В той час як концентрація інсуліну в портальних венах в два-десять разів більша, ніж у периферичному кровообігу. Приблизно половина кількості інсуліну плазми крові досягає печінки. Визначення С-пептиду дозволяє оцінювати стан  $\beta$ -клітин підшлункової залози людей, які страждають від діабету. С-пептид має здатність послаблювати клубочкову гіперфільтрацію та знижувати екскрецію альбуміну з сечею як при експериментальному, так і при цукровому діабеті [341].

Знижений рівень інсуліну в крові щурів з ЦД<sub>Е</sub> вірогідно впливав на зростання концентрації глюкози та відносного рівня глікозильованого гемоглобіну. У хворих на цукровий діабет глікування гемоглобіну є незворотнім процесом, який свідчить про ступінь компенсації захворювання за останні 2-3 місяця. Тому визначення глікозильованої форми гемоглобіну служить цінною діагностичною ознакою за діабету. Ступінь глікування прямо пропорційний концентрації глюкози і на тлі постійної гіперглікемії відбувається «зацукрювання» гемоглобіну. Підвищений рівень глікозильованого гемоглобіну є одним із ранніх показників порушення обміну вуглеводів [341].

У дослідженнях виявлено зростання загального гемоглобіну в крові щурів із ЦД<sub>E</sub>, що може свідчити про вихід еритроцитів із депо та їх здатність синтезувати достатню кількість гемоглобіну навіть за умови дефіциту інсуліну.

В еритроцитах ефективність транспортування глюкози через їхні мембрани не залежить від інсуліну. Тому, глюкоза може надходити до клітин і там метаболізуватися як по шляху гліколізу, так і пентозофосфатному. Зростання лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах тварин із ЦД<sub>E</sub> свідчить про мобілізацію енергетичних ресурсів для максимального утворення молекул АТФ, які необхідні для внутрішньоклітинних процесів, транспорту катіонів через мембрану та збереження її цілісності [342]. Зростання лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах крові щурів з ЦД<sub>E</sub> може бути зумовлено збільшенням частки мономерів М-типу її ізоензимного складу. Це підтверджується зростанням концентрації лактату щодо пірувату в крові тварин II групи, порівняно з I групою. Зростання співвідношення лактату до пірувату за ЦД<sub>E</sub> може бути показником ступеня порушення клітинного метаболізму [295]. Оскільки піруват – попередник утворення ацетил-КоА, первинного субстрату циклу трикарбонових кислот, зниження його концентрації в крові тварин за ЦД<sub>E</sub> викличе і зниження загального субстратного потоку в цьому циклі.

У дослідженнях також виявлено зростання лактатдегідрогеназної активності у тканинах тварин із ЦД<sub>E</sub>, зокрема в скелетних м'язах, печінці та підшлунковій залозі. Хоча у першій серії досліджень у печінці тварин із ЦД<sub>E</sub> спостерігалось зниження активності досліджуваного ензиму, порівняно з контролем, однак ці дані не були вірогідні.

Підвищення ЛДГ-ної активності може свідчити про інтенсифікацію анаеробного катаболізму глюкози у досліджуваних тканинах за ЦД<sub>E</sub>. Вважається, що анаеробний гліколіз переважає в скелетних м'язах при фізичній діяльності, тобто при відносній кисневій недостатності, та в деяких високоспеціалізованих клітинах (зокрема, в еритроцитах, в яких відсутні мітохондрії) або за певних патологічних умов, в т.ч. цукровому діабеті.

У скелетних м'язах, як інсулінозалежній тканині, мобілізація енергетичних ресурсів за рахунок достатньої кількості АТФ необхідна для їх скорочення та розслаблення. Для скелетних м'язів характерне переважання М<sub>4</sub> ЛДГ, активність якої корелює з переміщенням протеїну-транспортера глюкози ГЛЮТ-4 [343]. У клітинах цієї тканини інсулін збільшує швидкість надходження глюкози за рахунок активації внутрішньоклітинних процесів транслокації ГЛЮТ-4. Окрім того, він регулює експресію генів протеїнів-транспортерів глюкози [329].

Однак найбільші можливості щодо утилізації глюкози має печінка, в клітинах якої окрім повного набору ізоферментів ЛДГ експресується інший протеїн-транспортер глюкози ГЛЮТ-2, функціонування якого не контролюється інсуліном, що, власне, і дало підставу віднести печінку до інсулінонезалежних органів [343]. У печінці відбуваються активні метаболічні перетворення, які також потребують значних енергетичних витрат. Крім того, як відомо, основна роль печінки в обміні вуглеводів полягає у тому, що вона забезпечує сталість концентрації глюкози у крові. Зростання ЛДГ активності в печінці може свідчити про активацію як аеробних, так і анаеробних шляхів гліколізу в ній, оскільки там переважають гібридні фракції ізоензимів [344].

В той час, як у підшлунковій залозі тварин із ЦД<sub>E</sub> виявлено зростання як лактатдегідрогеназної, так і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності, що свідчить про активацію як анаеробного, так і аеробного метаболізму глюкози у тканині, яка відіграє особливу роль у розвитку ЦД<sub>E</sub>. Варто відзначити, що підшлункова залоза, як складно-альвеолярна залоза змішаної секреції, що виконує зовнішньо- та внутрішньосекреторну функції, при діабеті все ще продукує інсулін, але недостатню його кількість [343]. У  $\beta$ -клітинах підшлункової залози метаболізм глюкози має важливе значення для регуляції секреції інсуліну. Глюкоза транспортується глюкозними транспортерами та фосфорилується під дією глюкокінази з використанням АТФ. Проте гліколітичне розщеплення глюкози та подальше включення пірувату через ацетил-КоА в цикл трикарбонових кислот забезпечує біосинтез АТФ, який є основним рушієм глюкозо-індукованої секреції інсуліну [245].

У той же час в еритроцитах, тканинах печінки та скелетних м'язах тварин спостерігається зниження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності за ЦД<sub>E</sub>, що свідчить про пригнічення окисного метаболізму глюкози в пентозофосфатному шляху. NADPH, який синтезуються у ньому необхідні для процесів відновного біосинтезу, а також для подолання шкідливої дії АФО. Вони захищають як гемоглобін і еритроцити, так і інші клітини тканин від розпаду за дії різних агентів, що володіють окиснювальними властивостями.

Однією з найважливіших ланок у патогенезі цукрового діабету та його ускладнень вважається саме вільнорадикальне окиснення ліпідів та протеїнів [346,347]. У результаті вільнорадикального окиснення ліпідів утворюється велика кількість продуктів, до яких належать: гідропероксили ліпідів (первинні продукти ПОЛ) – нестійкі речовини, що легко піддаються перетворенню з утворенням більш стійких продуктів (альдегідів, кетонів, низькомолекулярних кислот), які є токсичні для клітини, призводять до порушення функцій мембран і запуску подальших патохімічних каскадів; дієнові кон'югати (утворюються шляхом відщеплення атома гідрогену від молекули поліненасиченої жирної кислоти); переокисні радикали – H<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>, HO<sup>2•</sup>; малоновий діальдегід (вторинні продукти ПОЛ) [348]; шифові основи (кінцеві продукти) – кон'юговані сполуки, що утворюються з поліненасичених жирних кислот, діальдегідів та інших вторинних продуктів ПОЛ [349,350]. У дослідженнях було встановлено, що за ЦД<sub>E</sub> вірогідно підвищився вміст ГПЛ та ТБК-активних продуктів у плазмі крові та усіх досліджуваних тканинах щурів, що свідчить про інтенсифікацію процесів пероксидного окиснення ліпідів при цукровому діабеті.

Підвищений рівень продуктів ПОЛ при цукровому діабеті може бути пов'язаний зі зміною функції мембран еритроцитів і клітин інших тканин організму. Це зумовлює пригнічення активності АОС, що призводить до накопичення радикалів супероксиду, які викликають максимальне пероксидне окиснення ліпідів та пошкодження тканин при діабеті. Крім цього, підвищення продуктів ПОЛ може бути пов'язане з підвищеним глікозилюванням протеїнів при цукровому діабеті. Глікозилювані протеїни можуть самі виступати джерелом

вільних радикалів. Існує чіткий зв'язок між інтенсивністю ПОЛ та концентрацією глюкози, що відіграє певну роль у посиленні пероксидного окиснення ліпідів при цукровому діабеті.

Мітохондріальні та мікосомальні мембрани містять велику кількість поліненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідів. Завдяки наявності подвійних зв'язків вони, ймовірно, більш чутливі до атаки вільними радикалами, що призводить до високої пероксидації ліпідів. Отже, швидкість пероксидного окиснення може бути високою, викликаючи більш високу концентрацію пероксидів ліпідів та вільних радикалів при цукровому діабеті.

Інтенсивність вільнорадикального окиснення в організмі залежить від багатьох чинників, але, в першу чергу, визначається злагодженим функціонуванням ензимів системи антиоксидантного захисту. Відомо [223], що СОД є одним з найважливіших ензимів системи антиоксидантного захисту організму. Цей ензим здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів, які перетворює на молекули пероксиду гідрогену, що є менш реакційно здатними. СОД активність вірогідно зростала в еритроцитах крові та підшлунковій залозі, спостерігалася тенденція до її підвищення у печінці, однак вірогідно знижувалася – у скелетних м'язах щурів із ЦД<sub>Е</sub>. Зростання СОД активності за ЦД<sub>Е</sub> може бути адаптаційним механізмом у відповідь на інтенсифікацію оксидативного стресу та підвищений вміст супероксид-аніон радикалу. У результаті реакції утворюється Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, який знешкоджується каталазою або глутатіонпероксидазою.

В еритроцитах крові, печінці, скелетних м'язах та підшлунковій залозі щурів із ЦД<sub>Е</sub> вірогідно знижувалися КАТ, ГП і ГР активності та вміст ВГ (лише у печінці та підшлунковій залозі). Зниження активності ензимів антиоксидантного захисту за ЦД<sub>Е</sub>, очевидно, зумовлене виснаженням їх запасів, що витрачаються на нейтралізацію вільних радикалів. За цукрового діабету встановлений чіткий зв'язок між інтенсивністю вільнорадикального окиснення та дисліпідемією, яка, у свою чергу, згубно впливає на функціональну активність клітин. [346,351,352]. Зміни активності ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах і тканинах

печінки, скелетних м'язів та підшлункової залози щурів з ЦД<sub>E</sub> свідчать про згубний вплив, який спричиняє комулювання  $O^{\cdot-}_2$  і  $H_2O_2$  у їх клітинах [353]. Виникає дисбаланс між утворенням та ліквідацією вільних радикалів, що утворюються через недостатність функціонування антиоксидантної системи.

Зниження вмісту відновленого глутатіону за умов стрептозотоцинового діабету узгоджуються з літературними даними [354,355]. Таке зниження вмісту відновленого глутатіону зумовлене, очевидно, посиленням використання його відновлювального агента, зменшенням швидкості відновлення, а також порушеннями, які виникають в процесі його біосинтезу. В еритроцитах при діабеті відновлений глутатіон інтенсивно використовується на підтримку нативного стану протеїнів, а також у процесах видалення  $H_2O_2$  і гідропероксидів органічних речовин в умовах оксидативного стресу. Водночас швидкість його регенерації є обмежена, оскільки відновні еквіваленти NADH/NADPH системи спрямовані на реакцію відновлення тривалентного (фері-іона) Феруму метгемоглобіну до двовалентного (феро-іона) [356].

Основним механізмом оксидативно-нітрозативного стресу, що лежить в основі виникнення і розвитку діабету є порушення в електрон-транспортному ланцюзі мітохондрій. Зростання вмісту супероксид-аніону за умов гіперглікемії, а також його здатність при взаємодії з NO утворювати цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних та метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету.

Еритроцити, які розглядаються переважно як транспортери метаболічних газів і поживних речовин для тканин, також приймають та інактивують NO, отримані з ендотелію. Це відбувається внаслідок швидкої реакції NO з оксигемоглобіном із утворенням метгемоглобіну та нітратів, тим самим обмежуючи NO, що доступний для вазодилатації. Однак дослідниками було показано, що еритроцити не тільки захоплюють NO, але виконують екзокринну функцію. Зокрема, еритроцити шляхом синтезу, транспортування та вивільнення продуктів метаболізму NO і АТФ, тим самим контролюють біодоступність NO для



судин [357]. У здорових кровоносних судинах NO, продукти реакції, каталізованої, ендотеліальною NOS, сприяють регуляції кровотоку та артеріального тиску, є інгібіторами активації та агрегації тромбоцитів, а також адгезії та міграції лейкоцитів [358].

За умов стрептозотин індукованого діабету в еритроцитах щурів спостерігалось вірогідне зростання активності загальної NOS та індукбельної NOS, в той час як конститутивна NOS активність вірогідно не змінювалася. Підвищення активності iNOS можна пов'язати зі збільшеним утворенням  $H_2O_2$  та впливом прозапальних цитокінів, які активують експресію mRNA iNOS [302,315,359]. Іншими дослідниками також було встановлено, що розвиток гіперглікемії за дії стрептозотину спричиняє активацію iNOS [360]. Гіперглікемія посилює аутоокиснення глюкози; неензиматичну глікацію біомолекул (протеїнів, ліпідів та ДНК) [361] і змінює рівень NO [359]. Слід відзначити, що частина NO, який синтезується iNOS, взаємодіє з супероксидним радикалом, що призводить до утворення пероксинітриту, який викликає ендотеліальну дисфункцію, нітрує цитоплазматичні протеїни, активує процеси ліпопероксидації та спричинює збільшення сорбітолу [59]. Це було підтверджено дослідженнями інших авторів, які встановили, що у діабетичних щурів знижувалася супероксиддисмутазна активність, що могло бути зумовлено швидкою реакцією між супероксидом та NO при утворенні пероксинітриту [89], рівень якого корелює з цукровим діабетом [362].

Еритроцити, крім транспортування кисню, є ключовими регуляторами судинних функцій шляхом опосередкованої регуляції вазодилатації нітроген оксидом [303].

При цукровому діабеті відзначаються відхилення в системі гомеостазу крові, що характеризуються гіперкоагуляцією і депресією, що може призводити до внутрікоронарного тромбозу, збільшення агрегації тромбоцитів, зниження фібринолітичної активності, підвищення синтезу і активності інгібітора активатора тканинного плазміногену-1 (PAI-1) [363].

Розуміння особливостей патогенетичної та терапевтичної значущості рівня макро- та мікроелементів у хворих цукровий діабет має велике значення для діагностики, профілактики та лікування цієї хвороби. Зокрема, мікроелементи є найважливішими каталізаторами різних біохімічних процесів, обміну речовин, відіграють значну роль в адаптації організму як у нормі, так і за патології. Хром і Цинк – відносяться до есенціальних мікроелементів, які виконують безліч фізіологічних і біохімічних функцій в організмі. Цинк є кофактором великої групи ензимів, що беруть участь у біохімічних процесах, використовується у транскрипції ДНК, системах транспортування протеїнів та сигнальних шляхах [364]. Цинк відіграє важливу роль у процесингу інсуліну в панкреатичних  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса. Він здійснює контроль реалізації ефектів інсуліну і секретується з інсуліном у відповідь на високі рівні глюкози [365]. Основна біологічна функція Хрому в організмі – це здатність підсилювати ефекти інсуліну, впливати на вуглеводний, ліпідний та протеїновий обмін і регуляцію метаболізму в цілому. Біологічною формою Хрому в організмі є хромулін, який функціонує як частина системи трансдукції сигналу інсуліну [366]. Сполуки мікроелементів, що використовувалися у дослідженнях синтезовані шляхом нанотехнології. Синтезовані цитрати мікроелементів мають високу біологічну активність, вони є нетоксичні, посилюють травлення, збільшують активність багатьох ензимів, вітамінів, тому добре засвоюються організмом і використовуються в обмінних процесах [367].

Мікроелементи нерівномірно розподіляються між тканинами і органами організму. Підвищене їх накопичення в тому чи іншому органі пов'язане з фізіологічним впливом того чи іншого елемента на життєдіяльність цих органів. У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що у тварин із ЦД<sub>E</sub> був вірогідно знижений вміст Хрому та Цинку у тканинах печінки і скелетних м'язів у порівнянні із тваринами контрольної групи. При додаванні до раціону тварин цитратів хрому та цинку, як окремо, так і поєднано, спостерігалось підвищення вмісту даних мікроелементів у досліджуваних тканинах стосовно їх рівня у тварин із ЦД<sub>E</sub>.

Біологічне засвоєння цитрату хрому в організмі впливало на показники метаболізму як в клітинах крові, так і інших тканин. Зокрема Хром, як відомо, впливає на різні ланки вуглеводного, ліпідного та протеїнового обміну [366]. Встановлено, що в крові щурів із ЦД<sub>Е</sub> за впливу цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг концентрація глюкози та рівень загального гемоглобіну вірогідно знижувалися стосовно відповідного рівня у тварин з ЦД<sub>Е</sub> II групи. Зниження рівня загального гемоглобіну може свідчити про інгібування його синтезу через недостатню кількість Феруму, який конкурує з Хромом за здатність транспортуватися трансферином, що, за певних умов, може супроводжуватися зниженням забезпечення транспорту кисню до тканин.

За дії цитрату хрому у дозі 25 мкг/кг в еритроцитах, скелетних м'язах і підшлунковій залозі тварин лактатдегідрогеназна активність вірогідно знижувалася, порівняно із показникам тварин II групи із ЦД<sub>Е</sub>, за винятком печінки, де активність ензиму підвищувалася. Зменшення лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах відбувалося на тлі зниження рівня лактату та підвищення – пірувату, що свідчить про нормалізацію гліколізу в крові тварин із ЦД<sub>Е</sub> за дії Хрому.

Зростання Г-6-ФДГ-ної активності за дії цитрату хрому в еритроцитах та печінці, призводить до інтенсифікації утворення НАДФН+Н<sup>+</sup>, який використовується надалі для біосинтезу різних органічних речовин, а також для підтримки нормальної концентрації відновленого глутатіону в клітинах.

Зниження Г-6-ФДГ-ної активності у підшлунковій залозі відносно активності ензиму у тварин з ЦД<sub>Е</sub> свідчить про нормалізацію протікання ПФШ у цій тканині за дії цитрату хрому в дозі 10 мкг/кг.

Хром, як елемент зі змінною валентністю, може як ініціювати пероксидні процеси, так і активувати систему антиоксидантного захисту. При дослідженні впливу цитрату хрому на стан про/антиоксидантної системи в організмі щурів із ЦД<sub>Е</sub> було встановлено пригнічення процесів ПОЛ в крові та досліджуваних тканинах. Зокрема, за дії цитрату хрому в дозі 10 мкг/кг в крові щурів

спостерігалось вірогідне зниження вмісту ТБК-активних продуктів, а в дозі 25 мкг/кг – вмісту ГПЛ, стосовно тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

Цитрат хрому також здійснював стимулюючий вплив на систему антиоксидантного захисту в організмі щурів із ЦД<sub>Е</sub>. Зокрема, в еритроцитах тварин за дії цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг виявлено вірогідне зниження СОД-ної та зростання КАТ-, ГП- і ГР-ної активності, порівняно з показниками у тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

У скелетних м'язах за дії цитрату хрому дозах 10 і 25 мкг/кг спостерігалось вірогідне зниження ТБК-активних продуктів ПОЛ та підвищення КАТ- і ГП-ої активності у порівнянні з тваринами з ЦД<sub>Е</sub>.

У печінці за дії цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг спостерігалось вірогідне зниження вмісту ГПЛ та підвищення ГП-ної активності, за дії цитрату хрому в дозах 10 і 25 мкг/кг виявлено зростання КАТ-ної активності і вмісту ВГ, порівняно з показниками у тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

У підшлунковій залозі за дії цитрату хрому в дозі 25 мкг/кг виявлено вірогідне зниження ТБК-активних продуктів і СОД-ної активності, та вірогідне підвищення КАТ-, ГП-, ГР-ної активності і вмісту ВГ, в той час як за дози 10 мкг/кг виявлено лише вірогідне зростання ГП- і ГР-ної активності та вмісту ВГ стосовно показників у тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

Антиоксидантна дія Cr(III) може бути зумовлена його властивістю здійснювати регуляторний вплив на експресію генів антиоксидантних ензимів [368]. За дії АФО у клітинах проходить активація експресії редокс-чутливих генів антиоксидантних ензимів, які необхідні для захисту клітин від токсичної дії оксидативного стресу. Основна регуляторна система, яка контролює експресію генів під дією АФО, представлена в клітині MAP (Mitogen-Activated Protein) – кіназами. АФО очевидно стимулюють MAP-кіназний каскад, регулюючи активність транскрипційних факторів NF-κB, AP-1 і ATF-2 [369]. Аналіз літературних даних дає підставу вважати, що Хром регулюючи активність MAP-кіназ, впливає на синтез антиоксидантних ензимів. Крім цього, можна припустити, що активність ензимів змінюється внаслідок впливу Хрому на рівень

і фізіологічну доступність їх кофакторів, в ролі яких виступають інші елементи, що може визначатися їх синергічною чи антагоністичною взаємодією.

За умов додавання цитрату хрому у дозах 10 і 25 мкг/кг в еритроцитах тварин вірогідно знижувалася загальна NOS та індукбельна NOS активність, в той час як конститутивна NOS активність вірогідно не змінювалася, порівняно з показниками у тварин із ЦД<sub>E</sub>. Отримані дані свідчать про позитивну дію цитрату хрому на зниження індукбельної NOS активності в еритроцитах за ЦД<sub>E</sub>, що може бути зумовлене інгібуванням експресії індукбельної NOS шляхом активації транскрипційного фактору *NF-κB*. У дослідженнях інших авторів було встановлено, що Cr(III) запобігає впливу сахарози на сигналізацію NO при гіпертензії, яка підсилена дієтою з високим показником глікемії. Cr(III) знижує гіпертензію, сприяє покращенню вазодилатаційної функції поряд з відновленням сигналів NO в артеріях [316].

Цитрат цинку також здійснював регуляторний вплив на метаболічні процеси в організмі тварин із ЦД<sub>E</sub>. Він впливав на регуляцію вуглеводного обміну як в крові, так і тканинах щурів із ЦД<sub>E</sub>. За дії цитрату цинку, в дозах 20 і 50 мг Zn/кг м.т., у крові щурів спостерігалось вірогідне зниження концентрації глюкози, глікозильованого гемоглобіну та тенденція до зниження вмісту загального гемоглобіну, в порівнянні із показниками у тварин із ЦД<sub>E</sub>. Очевидно, Цинк може сприяти збільшенню секреції інсуліну та фосфорилуванню його рецептора, підсилюючи транспортування глюкози в клітини [129,370].

Вірогідне зниження ЛДГ-ної активності за дії цитрату цинку, в дозі 50 мг Zn/кг м.т., в еритроцитах, печінці та скелетних м'язах порівняно із показниками у тварин з ЦД<sub>E</sub>, свідчить про нормалізацію протікання гліколізу за цукрового діабету. Зниження ЛДГ-ної активності в еритроцитах супроводжувалося вірогідним зниженням рівня лактату та підвищення рівня пірувату за додавання до раціону щурів з ЦД<sub>E</sub> цитрату цинку. Однак, варто відзначити, що ЛДГ-на активність еритроцитах за дії цитрату цинку в дозі 20 мг Zn/кг продовжувала вірогідно зростати за ЦД<sub>E</sub>. Очевидно, що дана доза була недостатньою для нівелювання дії цукрового діабету на ЛДГ-ну активність.

Відомо, що Цинк володіє здатністю стимулювати гліколіз та інгібувати гліюконеогенез [152]. Дослідження *in vitro* продемонстрували, що Цинк збільшував активність гліколітичних ензимів фосфофруктокінази та піруваткінази у залежності від дози та часу введення [155]. Однак ефекти Цинку та інсуліну не були адитивними, оскільки попередній вплив Цинку перешкодив стимуляції гліколітичних ензимів інсуліном. Крім того, у клітинах за впливу Цинку спостерігалася прогресуюча активація ERK2 / MAPK1 (мітогенактивованих протеїнкіназ-1) [155].

Встановлено, що глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність за дії цитрату цинку в дозі 20 мг Zn/кг м.т вірогідно підвищувалася у печінці, а в дозі 50 мг Zn/кг м.т – в еритроцитах, печінці і скелетних м'язах щурів, порівняно із активністю ензиму у тварин із ЦД<sub>E</sub>. Це свідчить про нормалізацію протікання пентозофосфатного шляху окиснення глюкози у досліджуваних тканинах тварин із ЦД<sub>E</sub> за дії цитрату цинку у вищій дозі.

Дослідниками встановлено, що крім гіпоглікемічних ефектів добавки Цинку у пацієнтів із цукровим діабетом знижують пероксидне окиснення ліпідів і, отже, демонструють антиоксидантні ефекти [169]. Цинк діє як кофактор супероксиддисмутази, регулює метаболізм глутатіону і експресію металлотіонеїнів, конкурує з Ферумом і Купрумом у клітинній мембрані, а також пригнічує ензим нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат-оксидазу (NADPH-оксидазу) [371,372].

При додаванні у раціон тварин цитрату цинку в плазмі крові тварин вірогідно знижувався вміст ГПЛ, та спостерігалася тенденція до зниження вмісту ТБК-активних продуктів та СОД-ної активності, у порівнянні з показниками тварин із ЦД<sub>E</sub>. Wang і інші [174] також досліджували вплив добавок Цинку на метаболізм в організмі щурів із діабетом і виявили знижену концентрацію глюкози в крові, малонового діальдегіду, а також підвищену експресію металлотіонеїну в печінці, що могло б пояснити сприятливий ефект цих добавок у пригніченні оксидативного стресу. Іншими авторами [373] було встановлено, що додавання сполук Цинку збільшувало активність СОД і зменшувало

концентрацію малонового діальдегіду в сироватці крові та підшлунковій залозі щурів із діабетом. Також за дії добавок цинку у тварин із діабетом знизився індекс пероксидного окиснення ліпідів, посилювався синтез відновленого глутатіону, нормалізувалася активність ензимів АОС – каталази, глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази, що знижувалася за діабету [177]. Очевидно, низький рівень Цинку порушує антиоксидантний захист в організмі. Антиоксидантні властивості Цинку є давно визнані [374]. При додаванні протягом восьми тижнів сполук цинку здоровим добровольцям встановлено зменшення рівня продуктів пероксидного окиснення ліпідів в плазмі, ДНК аддуктів та зниження мРНК TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$  порівняно з контрольними групами [199]. Таким чином, можна висунути гіпотезу, що зниження ускладнень діабету за добавок цинку можуть бути наслідком зменшення окиснювальних пошкоджень [216].

При додаванні у раціон щурів цитрату цинку в дозі 20 мг/кг, було відмічено вірогідне підвищення вмісту відновленого глутатіону у порівнянні із тваринами із ЦД<sub>E</sub>. Інші дослідники також підтвердили отримані нами дані [375], що при додаванні сульфату цинку у раціон тварин із діабетом виявлено підвищену концентрацію глутатіону та зменшення ПОЛ. Дія Цинку має велике значення на метаболізм глутатіону. Цинк впливає на експресію глутамат-цистеїн-лігазного ензимої системи, що бере участь в синтезі глутатіону, який безпосередньо діє на нейтралізацію вільних радикалів і опосередковано в якості кофактору глутатіонпероксидази [371,376]. За дії цитрату цинку виявлено також вірогідне підвищення ГП- і ГР-ної активності в еритроцитах стосовно активності у тварин із ЦД<sub>E</sub>.

У скелетних м'язах щурів за дії цитрату цинку в обох досліджуваних дозах вміст ГПЛ вірогідно знижувався. За дії цитрату цинку в дозі 50 мг/кг, вірогідно підвищувалися СОД-, КТ-, ГП-, ГР-на активності, порівняно із показниками у тварин із ЦД<sub>E</sub>. В той час, як за дії цитрату цинку в дозі 20 мг/кг СОД-на активність вірогідно знижувалася як стосовно контролю, так і стосовно тварин із ЦД<sub>E</sub>, що свідчить про недостатню кількість цієї дози для відновлення активності ензиму до рівня контролю.

За впливу цитрату цинку відбувалися зміни про/антиоксидантної системи у печінці щурів із ЦД<sub>E</sub>. За дії цитрату цинку в дозі 50 мг/кг у печінці вірогідно знижувався вміст ТБК-активних продуктів та СОД-на активність, а КАТ-, ГП-, ГР-на активність і вміст ВГ вірогідно підвищувалися, у порівнянні з показниками у тварин із ЦД<sub>E</sub>. Інші дослідники [377] підтвердили, що додавання Цинку зменшувало ПОЛ в печінці щурів із діабетом, підкреслюючи, що він може захистити печінку від оксидативного стресу. Зменшення неензиматичного глікозилювання в тканинах печінки підтверджує антиоксидантні властивості цього мінералу в зниженні ризику печінкових ускладнень, пов'язаних із цукровим діабетом 2-го типу. У дослідженнях [179] показано, що добавки цинку збільшували концентрацію металотіонеїну і зменшували ПОЛ в тканинах печінки щурів із діабетом, що підтверджує ефективність використання мінералу як антиоксидантної речовини і його роль в попередженні пошкоджень при цукровому діабеті.

У підшлунковій залозі за дії цитрату цинку у досліджуваних дозах було виявлено вірогідне зниження вмісту ТБК-активних продуктів, ГПЛ (лише за дії 50 мг Zn/кг) і СОД-ної активності та вірогідне підвищення КАТ-, ГП-, ГР-ної активності і вмісту ВГ, порівняно з показниками тварин із ЦД<sub>E</sub>.

Таким чином, однією з важливих функцій Цинку є участь в системі антиоксидантного захисту [278]. Крім цього, він може конкурувати з Ферумом і Купрумом, як антагоністами, за зв'язки з рецепторами на мембранах клітин і зменшувати утворення вільних радикалів, тим самим здійснюючи пряму антиоксидантну дію [378]. Також Цинк може захищати сульфгідрильні групи протеїнів за допомогою прямого зв'язування з ними чи просторового утруднення зв'язування з будь-якими іншими сайтами протеїнів, які є в безпосередній близькості до сульфгідрильних груп. Цинк здатний зменшити пошкодження клітин, які вже мають елементи сайт-специфічного окисного пошкодження.

За дії цитрату цинку у дозах 20 і 50 мг/кг виявлено вірогідне зниження активності індукбельної NOS, в той час як активність загальної NOS і конститутивної NOS вірогідно не змінювалися стовно показників у тварин із ЦД<sub>E</sub>.



Подібні результати були отримані іншими дослідниками, зокрема, аргіназна та NOS активність у сім'яній рідині безплідного пацієнта відновлювалися до нормальних значень після дії сульфату цинку [379]. Деякі докази можливої регуляторної ролі Цинку на активність індукцибельної NOS існують. Цинк є важливим структурним елементом індукцибельної NOS, тримаючи разом дві протеїнові субодиниці через тетраедричну координацію чотирьох цистеїнів, по два з них належать одному мономеру [380]. Таким чином, встановлено, що Цинк може контролювати активність індукцибельної NOS [381]. Є повідомлення, що індукцибельна NOS активність у активованих макрофагах *in vitro*, яка перевищує 90%, інгібується 100 мкМ Zn [89]. Було показано, що в кератиноцитах добавки Цинку зменшують активність індукцибельної NOS [382], але молекулярні механізми, відповідальні за регуляцію Цинком індукцибельної NOS, ще до кінця не вивчені.

Вважається, що Цинк, як важливий структурний елемент індукцибельної NOS, пригнічує її каталітичну активність. Виявлено, що Цинк знижує регуляцію експресії індукцибельної NOS і зменшує опосередковану цитокіном активацію промотору індукцибельної NOS. Цинк-опосередкована регуляція експресії індукцибельної NOS обумовлена пригніченням трансактивації NF-κB, що визначається експресією цільових генів, включаючи циклооксигеназу 2 та IL-1β [358].

Встановивши оптимальні дози цитрату хрому (25 мкг/кг) і цитрату цинку (50 мг/кг), які ефективно впливали на регуляцію вуглеводного обміну, стабілізацію про/антиоксидантної системи та активність NO-синтаз в організмі щурів із стрептозотоцин індукованим діабетом, було вирішено з'ясувати їх поєднаний вплив на окремі ланки метаболічних процесів.

За сумісного застосування цих сполук у крові щурів із ЦД<sub>E</sub> на тлі вірогідного зниження рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну та загального гемоглобіну було встановлено вірогідне підвищення концентрації інсуліну та С-пептиду, порівняно із показниками у тварин із ЦД<sub>E</sub>.

Цинк і Хром є мінеральними елементами, які впливають на функцію підшлункової залози, секрецію інсуліну та його дію. Зокрема, Цинк здатний регулювати синтез інсуліну та С пептиду підшлунковою залозою. Атоми Цинку разом із інсуліном та еквімолярною кількістю С-пептиду, у результаті відповіді на стимул (підвищення рівня глюкози), вивільняються в порталну венозну систему під час дегрануляції  $\beta$ -клітин [383]. У той час як Хром здатний впливати на інсулінорезистентність шляхом регулювання інсуліно-стимульованої передачі гормонального сигналу, про що свідчать підвищення рівня фосфорилування тирозинових рецепторів інсуліну, підвищення фосфорилування Akt<sup>308</sup> та Ser<sup>473</sup> та підвищення активності фосфоінозитол-3-кінази [366]. Саме активація фосфоінозитол-3-кінази є ланкою сигнального шляху, що стимулює трансмембранне перенесення глюкози у клітини, де вона метаболізується різними шляхами.

За сумісного застосування цитратів хрому (25 мкг/кг) і цинку (50 мг/кг) змінювалася активність ензимів вуглеводного обміну. Зокрема, ЛДГ активність вірогідно знижувалася в еритроцитах і тканинах скелетних м'язів та спостерігалася тенденція до її зниження у тканинах печінки і підшлункової залози. Крім цього, за дії цитратів хрому і цинку спостерігалось вірогідне зниження рівня лактату і тенденція до підвищення вмісту пірувату у порівнянні із показниками тварин із ЦДЕ. За сумісної дії сполук мікроелементів вірогідно підвищувалася Г-6-ФДГ-на активність в еритроцитах, тканинах печінки і скелетних м'язів, в той час у підшлунковій залозі – знижувалася стосовно тварин із ЦДЕ.

Зниження вмісту ГПЛ та ТБК активних продуктів у крові та тканинах щурів за сумісної дії цитратів цинку і хрому свідчить, з одного боку про інгібувальний вплив досліджуваних елементів, при збільшенні споживанні їх тваринами, на процеси пероксидного окиснення ліпідів в крові, печінці, м'язах і підшлунковій залозі, які характеризуються високою метаболічною активністю.

Пояснення механізмів інгібувального впливу Хрому і Цинку на пероксидні процеси в крові і тканинах щурів можна шукати в активації глутатіонзалежної антиоксидантної ензимної системи, яка нейтралізує пероксили ліпідів і підтримує

у відновленому стані SH-групи протеїнів, забезпечуючи цим їхню функціональну активність [384]. При сумісному додаванні до раціону тварин цитратів хрому і цинку в еритроцитах щурів ГП-на активність і вміст ВГ вірогідно зростали, а СОД-на активність вірогідно знижувалася, стосовно тварин із ЦД<sub>Е</sub>. У скелетних м'язах за сумісної дії цитратів мікроелементів спостерігалось вірогідне зниження вмісту ГПЛ і ТБК-активних продуктів та вірогідне підвищення СОД-, КАТ-, ГР-ної активності і тенденція до підвищення ГП-ої активності та вмісту ВГ, стосовно II групи. У тканинах печінки за сумісної дії цитратів вірогідно знижувався вміст ГПЛ і ТБК-активних сполук та вірогідно підвищувалася КТ-, ГП-, ГР-на активність і вміст ВГ, в той час СОД-на активність знижувалася. Аналізуючи стан про/антиоксидантної системи у підшлунковій залозі тварин дослідної групи встановлено вірогідне зниження вмісту продуктів ПОЛ і СОД-ної активності, однак підвищення КТ-, ГП- і ГР-ної активності, стосовно показників у тварин із ЦД<sub>Е</sub>.

За умови сумісного додавання цитратів хрому і цинку спостерігалось вірогідне зниження активності загальної NOS та індукцбельної NOS і тенденція до підвищення активності конститутивної NOS порівняно із тваринами із ЦД<sub>Е</sub>.

Деякі дослідники [385] у своїх дослідженнях не виявили механізму дії Хрому та Цинку, на відміну від інших важких металів, на синтез NO опосередковано через цитокіни (TNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), що синтезуються макрофагами. Очевидно, Cr і Zn можуть пригнічувати активність iNOS внаслідок безпосереднього модифікування ензимної активності через кофактори. Крім цього, ці метали можуть гальмувати або посилювати синтез NO за допомогою регулювання захисних механізмів або індукції гіперчутливості [315].

Аналіз виявлених нами ефектів антидіабетичної дії цитратів хрому і цинку дає підстави стверджувати, що їхня метаболічна дія реалізується, по-перше, за панкреатичним механізмом і є результатом прямого протекторного впливу мікроелементів на структурно-функціональний стан острівцевого апарату підшлункової залози, по-друге – шляхом регулювання інсуліно-стимульованої передачі гормонального сигналу. Окрім того, встановлене нами підвищення

толерантності до глюкози у разі введення цих сполук тваринам з ЦД<sub>E</sub> може бути пов'язано з регуляцією вуглеводного обміну в клітинах тканин організму. Також ефектом прямої дії сполук є їх здатність попереджати розвиток оксидативно-нітрозативного стресу у клітинах досліджуваних тканин щурів за стрептозотоцинового діабету впливаючи на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу шляхом скавенджерування вільних радикалів та запобігання інгібування ключових компонентів ензиматичної ланки АОС.

Хоча докази антиоксидантних властивостей Цинку і Хрому є переконливими, точні механізми їх впливу досі мало відомі. Майбутні дослідження, дозволять глибше розкрити механізми антиоксидантних властивостей Хрому і Цинку, що дасть можливість з'ясувати нові властивості органічних сполук цих мікроелементів і розробити на їх основі медичні засоби з метою профілактики і лікування цукрового діабету.

## ВИСНОВКИ

У дисертації експериментально обґрунтовано ефективність застосування цитратів хрому та цинку, синтезованих методом нанотехнології, з метою корекції окремих ланок вуглеводного обміну та системи антиоксидантного захисту в крові і тканинах щурів за умов стрептозоточин індукованого цукрового діабету.

1. У крові щурів із стрептозоточин індукованим цукровим діабетом розвивалася стійка гіперглікемія, що зумовлена зростанням концентрації глюкози та глікозильованого гемоглобіну. Додавання до раціону тварин цитратів хрому і цинку як окремо, так і сумісно, запобігало розвитку гіперглікемії у крові щурів із ЦД<sub>Е</sub>, про що свідчило вірогідне зниження концентрації глюкози та рівня глікозильованого гемоглобіну.
2. У щурів із ЦД<sub>Е</sub> виявлено підвищення лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах і досліджуваних тканинах, а також зростання вмісту лактату та зниження пірувату в крові, що може свідчити про недостатнє енергопостачання клітин та порушення їх метаболізму. За сумісного впливу цитратів хрому і цинку спостерігалася зменшення лактатдегідрогеназної активності в еритроцитах на 37 % і скелетних м'язах – на 11 %, а також нормалізація співвідношення лактат/піруват у крові тварин із ЦД<sub>Е</sub>.
3. У щурів із ЦД<sub>Е</sub> виявлено зниження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності в еритроцитах, печінці та скелетних м'язах, що свідчить про гальмування пентозофосфатного шляху перетворення глюкози – основного постачальника НАДФН для глутатіонової антиоксидантної системи. За впливу цитратів хрому і цинку, як окремо, так і сумісно, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність підвищувалася в еритроцитах, печінці та скелетних м'язах тварин із ЦД<sub>Е</sub>.
4. У тварин із ЦД<sub>Е</sub> встановлено інтенсифікацію оксидативного стресу та порушення функціонування антиоксидантної системи, про що свідчить зростання вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів у крові та тканинах, підвищення супероксиддисмутазної активності в еритроцитах та підшлунковій залозі, однак зниження – у скелетних м'язах, а також зменшення

каталазної, глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної активності та вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах і досліджуваних тканинах щурів із ЦД<sub>E</sub>.

5. За сумісного впливу цитратів хрому і цинку в організмі щурів із ЦД<sub>E</sub> нормалізувався стан про/антиоксидантної системи, про що свідчить вірогідне зниження вмісту гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів в плазмі їх крові та тканинах, супероксиддисмутазної активності – в еритроцитах, печінці та підшлунковій залозі, підвищення вмісту відновленого глутатіону, глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної та каталазної активності в еритроцитах і досліджуваних тканинах.
6. В еритроцитах тварин із ЦД<sub>E</sub> зростала загальна та індукцибельна NO-синтазна активність, що може призвести до гіперпродукції NO, утворення пероксинітриду та виникнення оксидативно-нітрозативного стресу. За сумісної дії цитратів хрому і цинку у щурів із ЦД<sub>E</sub> нормалізувалася активність NO-синтаз, зокрема вірогідно знижувалася загальна NO-синтазна активність на 30% та індукцибельна NO-синтазна активність – на 55%.
7. За умов стрептозотоцин індукованого діабету у крові щурів знижувалася концентрація С-пептиду – на 26% та інсуліну на 45%, що свідчить про пригнічення функціонального стану інкреторного апарату підшлункової залози та зниження секреції цього гормону. За сумісної корегуючої дії цитратів хрому і цинку на ці процеси спостерігалось вірогідне підвищення вмісту С-пептиду та інсуліну в крові щурів із ЦД<sub>E</sub>.
8. У щурів із експериментально індукованим цукровим діабетом встановлено знижений рівень Хрому і Цинку у печінці та скелетних м'язах, що може бути зумовлено посиленою їх екскрецією з організму. За умов додавання до раціону тварин із ЦД<sub>E</sub> цитратів хрому і цинку як окремо, так і сумісно, спостерігалось вірогідне підвищення вмісту цих мікроелементів у тканинах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. About diabetes. World Health Organization. Archived from the original on 31 March 2014. Retrieved 4 April 2014.
2. Diabetes Fact sheet N°312. WHO. October 2013. Archived from the original on 26 August 2013. Retrieved 25 March 2014.
3. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Miles JM, Fisher JN. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1335–43. doi:10.2337/dc09-9032/
4. Joan K Bardsley, Laura Want. Overview of Diabets: Review. *Crit Care Nurs*. 2004;27(2):106-112. doi: 10.1097/00002727-200404000-00002.
5. Ullah Asmat, Khan Abad, Khan Ismail. Diabetes mellitus and oxidative stress. A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016; 24(5):547–553.
6. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS*, 2008;4 (2): 89-96.
7. Moussa S.A. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian J. Biophys*. 2008; 18(3):225–236.
8. Ayepola, O.R., Brooks, N.L., Oguntibeju, O.O.[Internet] Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids. 2014; doi: 10.5772/57282
9. Constantina Heltianu , Alexandra Robciuc, Gabriela Botez, Claudia Musina, Camelia Stancu, et al.. Modified low density lipoproteins decrease the activity and expression of lysosomal acid lipase in human endothelial and smooth muscle cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2011;61(1):209–216. doi: 10.1007/s12013-011-9190-8
10. Vitak T.Y., Wasser S.P., Nevo E., Sybirna N.O.. Effect of medicinal mushrooms on L-arginine/NO system in red blood cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Advances in Diabetes and Metabolism*. 2016:25–31.

11. Cockcroft J R , Webb D J, Wilkinson I B. Arterial stiffness, hypertension and diabetes mellitus. *J Hum Hypertens.* 2000;14(6):377–380. doi: 10.1038/sj.jhh.1001023
12. James PE, Lang D, Tufnell-Barret T, Milsom AB, Frenneaux MP. Vasorelaxation by red blood cells and impairment in diabetes. *Circ Res.* 2004; 976–983.
13. Khalid Siddiqui, Nahla Bawazeer, and Salini Scaria Joy. Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes. *Scientific World Journal.* 2014; Article ID 461591, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2014/461591>
14. Nourmohammadi I., Shalmani I. K., Shaabani M. et al., Zinc, copper, chromium, manganese and magnesium levels in serum and hair of insulin-dependent diabetics. *Archives of Iranian Medicine.* 2000;3(3):88–100.
15. William T. Cefalu, Frank B. Hu. Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(11):2741-2751.
16. Kazi T. G., Afridi H. I., Kazi N. et al. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biological Trace Element Research.* 2008; 122(1):1–18.
17. Olechnowicz J., Tinkov A., Skalny A., Joanna Suliburska. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci.* 2018;68(1):19–31. doi: 10.1007/s12576-017-0571-7
18. Tang X. and Shay N. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *Journal of Nutrition.* 2001;131(5):1414–1420.
19. Nicolas Wiernsperger, JeanRobert Rapin. Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2010; 2: 70p. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-70>
20. Vincent JB. The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). Department of Chemistry The University of Alabama Tuscaloosa, USA. 2007.277 p.
21. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:4–14.



22. Vehik K, Dabelea D. The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof . *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27:3–13.
23. DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329:977–986.
24. Cimponeriu D, Craciun AM, Apostol P, Radu I, Guja C, et al. The genetic background of diabetes chronic complications: Genetics of diabetes. The truth unveiled. Cheta D (Ed), Acad Rom & S. Karger AG, Bucharest/Basel, chapter 4; 2010:193–334.
25. Dunn MF. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer a review. *Biometals.* 2005;18:295–303.
26. Lim E.L., Hollingsworth K.G., Aribisala B.S., Chen M.J., Mathers J.C., Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: Normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia.* 2011;54:2506–2514. doi: 10.1007/s00125-011-2204-7
27. Figueiredo LF, Schuster S, Kaleta C, Fell DA, Can sugars be produced from fatty acids? A test case for pathway analysis tools. *Bioinformatics;* 2009;25(1): 152–158.
28. Thivolet C. Beta cells in type-1 diabetes: victims or activators of T cell response. *Diabetes Metab. (Paris)* 2002;28:267–269.
29. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ.* 2006. 175 (2):165c .
30. Narendran P, Estella E, Furlanos S. Immunology of type 1 diabetes. *Q. J. Med.* 2005; 98:547–556.
31. Barclay L. Type 1 diabetes. new medical therapy: nmt briefs, 2005. thomsoncenterwatch, [www.centerwatch.com](http://www.centerwatch.com).
32. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005.365:1333–46.

33. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*; 2006.444:840–46.
34. Burcelin R, Knauf C, Cani PD. Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab*. 2008; 34(2):49–55.
35. Mulder H, Nagorny C, Lyssenko V, Groop L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 2009;52: 1240–49.
36. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006; 368:1696–705.
37. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115:1111–1119.
38. Yang Q. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436:356–62.
39. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002; 277: 423:94–98.
40. Bates SH, Kulkarni RN, Seifert M, Myers MG. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and - independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:169–78.
41. Robertson PR. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* 2004;279:351–354.
42. Hull RL, Westermark GT, Westermark P, Kahn SE. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:36:29–43.
43. Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2010;654:501–14.
44. Ehses JA, Ellingsgaard H, Boni-Schnetzler M, Donath MY. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. *Arch Physiol Biochem* 2009;115:240– 47.

45. De Fronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(2):157–63. doi: 10.2337/dc09-S302.
46. Hojlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J*. 2014;61(7): 4890c.
47. Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, et al. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem*. 2002; 277(1):793–803.
48. Hammes HP, Bartmann A, Engel L, Wülfroth P. Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. *Diabetologia*. 1997; 40:629–634.
49. Cimato AN, Facorro GB, Piehl LL, Sarrasague MMM, Grinspon D, et al. Oxidative damage and antioxidant status in diabetes mellitus and rheumatoid arthritis: A comparative study. *Open Clin Chem J*. 2008;1:92–98.
50. Bajaj S, Khan A. Antioxidants and diabetes. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012; 16:267–271.
51. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058–1070
52. Vaag A, Dmsbo P, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H. Hyperglycemia compensates for the defects in insulin mediated glucose metabolism and in the activation of glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetol* 1992;35:80–88.
53. Di Naso FC, Dias AS, Porawski M, Marroni NAP. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011;754132. doi: 10.1155/2011/754132.
54. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med*. 1991;10:339–352.
55. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues

- of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:227-232.
56. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212:167-178.
  57. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107:1058-1070.
  58. Ceriello A., Mercuri F., Quagliaro L., et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma. Evidence of oxidative stress *Diabetologia.* 2001;44:834–838.
  59. Дрель В. Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу. *Biol. Stud.* 2010;4(2);141–158. doi: <https://doi.org/10.30970/sbi.0402.085>
  60. Schmitz H.D. Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. *Eur. J. Cell. Biol,* 2001;80(6):419–427.
  61. Nogueira-Machado J.A., Chaves M.M. From hyperglycemia to AGE-RAGE interaction on the cell surface: a dangerous metabolic route for diabetic patients. *Expert. Opin. Ther. Targets,* 2008;12(7):871–82.
  62. Ja-Ryong Koo, Nosratola D. Vaziri Effects of diabetes, insulin and antioxidants on NO synthase abundance and NO interaction with reactive oxygen species. *Kidney International.* 2003;63(1):195–201.
  63. Ceriello A., Mercuri F., Quagliaro L., et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: Evidence of oxidative stress *Diabetologia;* 2001;44:834–838.
  64. Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L., et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404:787–790.
  65. Rosen P, Nawroth PP, King G, et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: A summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society *Diabetes Metab Res Rev.*2001;17:189–212.
  66. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49:3–8.

67. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor .*Nature*. 1986;320:454–456.
68. Squadrito GL, Pryor WA. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide *Chem Biol Interact*. 1995;96:203–206.
69. Van der Vliet A., Eiserich J.P., O'Neill C.A., et al. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: A closer look. *Arch Biochem Biophys*. 1995;319:341–349.
70. Ja-Ryong Koo and Norsratola D. Vaziri/ Effects of diabetes, insulin and antioxidants on NO synthase abundance and NO interaction with reactive oxygen species. *Kidney International*. 2003;63:195–201.
71. Ding Y., Vaziri N.D., Coulson R., et al. Effect of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagons on endothelial nitric oxide synthase expression . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:11–17.
72. Keynan S., Hirshberg B., Levin-Iaina N., et al. Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*. 2000;58: 740–747.
73. Trachtman H., Futterweit S., Crimmins D.L. High glucose inhibits nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1276–1282.
74. Yagihashi N., Nishida N., Seo H.G. Expression of nitric oxide synthase in macula densa in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia*. 1996;39:793–799.
75. Yu W.J., Juang S.W., Chin W.T. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2000;68:625–634.
76. Gabbai FB, Blantz RC. Role of nitric oxide in renal hemodynamics *Semin Nephrol*; 1999;19:242–250
77. Welch WJ, Wilcox CS, Thomson SC. Nitric oxide and tubuloglomerular feedback. *Semin Nephrol*. 1999; 9:251–262.
78. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000;279:573–583.

79. Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, et al. Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 1998; 41:1426–1434.
80. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia*. 2001;44:129–146.
81. Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*; 2000;43:550–557.
82. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга. *Вестн. РАМН*. 2000;4:5–11.
83. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих .М.: Наука, 1998: 159с.
84. Shiva S., Brookes P.S., Patel R.P. et. al. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. 2001;98(13):7212–7217.
85. Alugoju Phaniendra, Dinesh Babu Jestadi, and Latha Periyasamy. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
86. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S- нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. *Биохимия*. 1998;63(7):924–928.
87. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. *Вестн. РАМН*. 2000;4:3–5.
88. Dahm CC, Moore K., Murphy M.P. Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J. Biol. Chem*. 2006; 281(15):10056–10065.
89. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Disc*. 2007; 6:662–680.

90. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза. Вестн. РАМН. 2000;4:30–34.
91. Реутов В.П. Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота. Биохимия. 1999;64(5): 634–651.
92. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. Вестн. РАМН. 2000;4:35–41.
93. Dejam A., Hunter C.J., Pelletier M.M. et al. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. Blood. 2005;106(2):734–739.
94. Недоспаев А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях. Биохимия. 1998; 63(7):881–904.
95. Wang Y. Marsden P.A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 1995;4:12–22.
96. Celia H. Tengan and Carlos T. Moraes. NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells. Biochim Biophys Acta. 2017; 1858(8):573–581.
97. Dijkstra G., H. van Goor, P.L. Jansen, H. Moshage. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. Curr. Opin. Investig. Drugs. 2004;5(5):529–536.
98. Ulrich Förstermann and William C. Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012;33(7):829–837.
99. Nussler AK., Silvio M. Di, Billiar T.R. et al. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. J. Exp. Med. 1992;176:261–264.
100. Gordon-Smith T. Structure and function of red and white blood cells. Medicine. 2013; 41: 193-199. Bodnar TP, Kozinec GI. Morphofunctional state of peripheral blood erythrocytes in late vascular complications of type 2 diabetes mellitus (literature review). Clin Lab Diagn. 2002;12:22–34.
102. Sailaja YR, Baskar R, Srinivas Rao CS, Saralakumari D. Membrane lipids and protein-bound carbohydrates status during the maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. Clin Chim Acta. 2004;341:185–192.

103. Vahalkar GS, Haldankar VA. RBC membrane composition in insulin dependent diabetes mellitus in context of oxidative stress. *Indian J Clin Biochem.* 2008;23:223–226.
104. Venerando B, Fiorilli A, Croci G, Tringali C, Goi G, Mazzanti L, Curatola G, Segalini G, Massaccesi L, Lombardo A. Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients. *Blood.* 2002;99:1064–1070.
105. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization. WHO/NCD/NCS/99.2 1999; 59.
106. Diabetes Atlas. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation 2013; Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
107. Alam F, Islam MA, Kamal MA, Gan SH. Updates on Managing Type 2 Diabetes Mellitus with Natural Products: Towards Antidiabetic Drug Development. *Curr Med Chem.* 2016; .
108. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):a007641. doi: 10.1101 / cshperspect.a007641
109. Diabetes Atlas. 3rd ed. Brussels: International Diabetes Federation 2006; Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
110. Tuch B, Dunlop M, Proietto J. Diabetes research: A guide for postgraduates. Harwood: Harwood Academic Publishers 2004;128c.
111. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014;383:69-82.
112. Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004;66 (1):27-32.
113. Harjutsalo V, Forsblom C, Groop PH. Time trends in mortality in patients with type 1 diabetes: nationwide population based cohort study. *BMJ.* 2011;343:d5364.
114. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia.* 2003;46:305-321.



115. Pak IV. Modern ideas about the etiology and pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Vestnik KRSU*. 2012; 12:130-133
116. Forst T, Hach T, Kunt T, Weber MM, Pfützner A. Molecular Effects of C-Peptide in Microvascular Blood Flow Regulation. *Rev Diabet Stud*. 2009;6(3): 159–167.
117. Цинкодефіцитні стани: сучасні погляди на проблему (Інформація АТ Кутнівського фармацевтичного заводу «Польфа» (Польща). *Український медичний часопис*. 1999;5(13):139-144.
118. Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes – clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem*. 2009; 20(6):399–417.
119. Bentley PJ, Grubb BR. Experimental dietary hyperzincemia tissue disposition of excess zinc in rabbits. *Trace. Elem. Med*. 1991;8:202–207.
120. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc*. 2001;101:294–301..
121. Llobet JM, Domingo JL, Colomina MT, Mayayo E, Corbella J. Subchronic oral toxicity of zinc in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 1988;41:36–43.
122. King JC., Cousins R.J. edited by Shils M. E., Shike M., Ross A. C. et al. Zinc. In: *Modern Nutrition in Health and Disease* (10th ed.). Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2005:271– 285.
123. Nazanin Roohani, Richard Hurrell, Roya Kelishadi, and Rainer Schulin. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*. 2013;18(2):144–157.
124. Moser-Veillon P.B. Zinc needs and homeostasis during lactation. *Analyst*. 1995; 120: 895–897.
125. Коваль С.Б. Реактивні зміни циркулюючих нейтрофільних гранулоцитів при фізіологічному та ускладненому гестаційному процесі. *Фізіологічний журнал*. 2003;1:67– 76.
126. Єщенко Ю.В. Вміст цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарата підшлункової залози: автореф. дис. на здобуття наук.

- ступеню канд. біол. наук: спец. 03.00.13. «Фізіологія людини та тварин». Ю.В. Єщенко. К., 2004. 20с.
127. Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:24085–24089.
128. Marcellini F., Giuli C., Papa R. et al. Psychosocial and biochemical interactions in aging: preliminary results from an Italian old sample of «Zincage» project. *Arch. Gerontol. Geriatr*. 2007; 44(1):259–269.
129. Miao X, Sun W, Fu Y, Miao L, Cai L. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med*. 2013;7:31–52.
130. Maret W. Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals*. 2011; 24(3): 411–418.
131. Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):711–722.
132. Василевская Л.С., Орлова С.В., Карушина Л.И. Значение цинка в обмене веществ. *Микроэлементы в медицине*. 2009;3:25-26.
133. Колесник О.П., Созонюк Т.В., Ариповський О.В. Дослідження вмісту мікроелементів (Cu, Zn, Fe) у крові хворих на ішемічну хворобу серця та мігрень, асоційовану з гелікобактером . *Сімейна медицина*. 2010;1:95–99.
134. Myers SA. Zinc transporters and zinc signaling: new insights into their role in type 2 diabetes. *Int J Endocrinol*. 2015.
135. Guy A, Rutter PC, Bellomo EA, Maret W, Mitchell RK, Hodson DJ, et al. Intracellular zinc in insulin secretion and action: a determinant of diabetes risk? *Proc Nutr Soc*. 2016;75(01):61–72.
136. Kimura T, and Kambe T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: an overview and perspective. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12).336p.
137. Wijesekara N, Chimienti F, Wheeler MB. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11:202–214.

138. Kambe T. An overview of a wide range of functions of ZnT and zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(6): 1036–1043.
139. Chimienti F, Favier A, Seve M. ZnT-8, a pancreatic Beta-cell-specific zinc transporter. *Biometals.* 2005;18(4):313–317.
140. Xu Y, Yan Y, Seeman D, Sun L, Dubin PL. Multimerization and aggregation of native-state insulin: effect of zinc. *Langmuir.* 2012;28(1):579–586.
141. Sudmeier J. L. et al. Cadmium-113 nuclear magnetic resonance studies of bovine insulin: two-zinc insulin hexamer specifically binds calcium. *Science.* 2001;212:560–562.
142. Ishihara H. et al. Islet  $\beta$ -cell secretion determines glucagon release from neighbouring  $\alpha$ -cells. *Nat Cell Biol.* 2003;5:330–335.
143. Kambe T., Yamaguchi-Iwai Y., Sasaki R., Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:49–68.
144. Eizirik D. L, Darville M. Y. Beta-cell apoptosis and defence mechanisms: lesions from type 1 diabetes. *Diabetes.* 2001;50(1):64–69.
145. Nordberg M., Nordberg G. F. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol. Biol.* 2000;46:451–463.
146. Башкірова Л.М. Біологічна роль деяких есенціальних макро- та мікроелементів. *Ліки України.* 2006;3:59–64.
147. Mocchegiani E., Giacconi R., Costarelli L. et al. Zinc deficiency and IL-6 – 174 G/C polymorphism in old people from different European countries: effect of zinc supplementation. ZINCAGE study. *Exp. Gerontol.* 2008;43(5): 433–444.
148. Ananda S Prasad Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Mol Med.* 2008; 14(5-6):353–357.
149. Chang Y. Z., Qian Z. M, Wang K. Effects of development and iron status on ceruloplasmin expression in rat brain. *J. Cell. Physiol.* 2005;204(2):623–631.
150. Tsotson G., Dendrinou-Samara C., Ekaterinadon I. V., Kortsaris A. H. Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc deficient humans. *Am. J. Physiol.* 1997;272(1):1002–1007.

151. Myers SA, Nield A, Myers M. Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Metab.* 2012; 2012:173712. doi: 10.1155/2012/173712.
152. Brand IA, Kleineke J. Intracellular zinc movement and its effect on the carbohydrate metabolism of isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1996; 271(4): 1941–1949. doi: 10.1074/jbc.271.4.1941.
153. Olechnowicz J., Tinkov A., Skalny A., and Joanna Suliburska. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci.* 2018;68(1):19–31.
154. Siyu Chen, Jinchun Qian, Xiaoli Shi, Tingting Gao, Tingming Liang, Chang Liu. Control of hepatic gluconeogenesis by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Molecular Endocrinology.* 2014;28(12):1987–1998, <https://doi.org/10.1210/me.2014-1164>
155. Canesi L, Betti M, Ciacci C, Gallo G. Insulin-like effect of zinc in mytilus digestive gland cells: modulation of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Gen Comp Endocrinol.* 2001;122(1):60–66.
156. Tamaki N, Ikeda T, Funatsuka A. Zinc as activating cation for muscle glycolysis. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1983;29(6):655–662.
157. Filippi C, Pryde A, Cowan P, Lee T, Hayes P, Donaldson K, et al. Toxicology of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on hepatocytes: impact on metabolism and bioenergetics. *Nanotoxicology.* 2015;9(1):126–34.
158. Sales C.H., Pedrosa L.F., Lima J.G. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Clin. Nutr.* 2011;30(3):359–364.
159. Маркевич В.Е., Глущенко Н.В. Особливості мікроелементного та енергетичного забезпечення дітей, хворих на цукровий діабет. *Вісн. Сум. держ. ун-ту.* 2010;1:112–122.
160. Седов К.Р, Бобовская А.Г. Уровень некоторых элементов в крови больных сахарным диабетом. *Тер. архив.* 2007;50(11):56–59.

161. Kasi T.G., Afridi H.I., Kasi N. Copper, chromium, manganese, iron and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 2010; 122(1):1–18.
162. Zhao C., Wang H., Zhang J. Feng Correlations of trace elements, glucose and body compositions in type 2 diabetics. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2009;37(5): 600–601.
163. Zheng Y., Li X.K., Wang Y. et al. The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators. *Hemoglobin.* 2010;32( 1-2):135–145.
164. Самигжонов А.А., Эргашева М.Ж., Т.С. Саатов Влияние координат-ционного соединения цинка на поглощение глюкозы и активность пируватдегидрогеназы. *Пробл. эндокринологии.* 2008; 48(6):48–50.
165. Хворостинка В.Н., Лахно О.В., Цивенко О.И. Особенности нарушений микро- и макроэлементного спектра крови при жировой дистрофии печени у больных сахарным диабетом 2 типа. *Международный эндокринологический журнал.* 2007; 3:23–26.
166. Щербак О.В., Пешко А.О., Кирієнко Д.В. Цинк дефіцитні стани при цукровому діабеті та їх корекція. К., 2009. 16 с.
167. Ruiz C., Alegria A., Barbery R. et al. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 1998;12(2):91–95. doi: 10.1016/s0946-672x(98)80031-x.
168. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем. *Успехи современного естествознания.* 2009; 7:37–41.
169. Anderson RA, Roussel A-M, Zouari N, Mahjoub S, Matheau J-M, and Kerkeni A. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001;20:212–218.
170. Blostein-Fujii A, Di Silvestro RA, Frid D, Katz C, Malarkey W. Short-term zinc supplementation in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effects on plasma 5'-nucleotidase activities, insulin-like growth factor I concentrations, and lipoprotein oxidation rates in vitro. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(3):639–642.

171. Pathak A, Sharma V, Kumar S, Dhawan DK. Supplementation of zinc mitigates the altered uptake and turnover of  $^{65}\text{Zn}$  in liver and whole body of diabetic rats. *Biometals*. 2011;24(6):1027–1034.
172. Faure P, Benhamou PY, Perard A, Halimi S, Roussel AM. Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation. *Eur J Clin Nutr*. 1995;49(4):282–288.
173. Duzguner V, Kaya S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(10):1481–1486.
174. Wang X, Li H, Fan Z, Liu Y. Effect of zinc supplementation on type 2 diabetes parameters and liver metallothionein expressions in Wistar rats. *J Physiol Biochem*. 2012;68(4):563–572.
175. Konukoglu D, Turhan MS, Ercan M, Serin O. Relationship between plasma leptin and zinc levels and the effect of insulin and oxidative stress on leptin levels in obese diabetic patients. *J Nutr Biochem*. 2004; 15(12): 757–760.
176. Vijayaraghavan K, Iyyampillai S, Subramanian SP. Antioxidant potential of zinc-flavonol complex studied in streptozotocin-diabetic rats. *J Diabetes*. 2013; 5(2): 149–156.
177. Tang Y, Yang Q, Lu J, Zhang X, Suen D, Tan Y, et al. Zinc supplementation partially prevents renal pathological changes in diabetic rats. *J Nutr Biochem*. 2010;21(3):237–46.
178. Ohly P, Dohle C, Abel J, Seissler J, Gleichmann H. Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000;43(8): 1020–1030.
179. Özcelik D, Nazıroglu M, Tunçdemir M, Çelik Ö, Öztürk M, Flores-Arce MF. Zinc supplementation attenuates metallothionein and oxidative stress changes in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res*. 2012;150(1–3):342–349. doi: 10.1007/s12011-012-9508-4.

180. Zimny S, Gogolin F, Abel J, Gleichmann H. Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch Toxicol.* 1993;67(1):61–65.
181. Wang J, Song Y, Elsherif L, Song Z, Zhou G, Prabhu SD, et al. Cardiac metallothionein induction plays the major role in the prevention of diabetic cardiomyopathy by zinc supplementation. *Circulation.* 2006;113(4):544–54.
182. Liang T, Zhang Q, Sun W, Xin Y, Zhang Z, Tan Y, et al. Zinc treatment prevents type 1 diabetes-induced hepatic oxidative damage, endoplasmic reticulum stress, and cell death, and even prevents possible steatohepatitis in the OVE26 mouse model: Important role of metallothionein. *Toxicol Lett.* 2015; 233(2):114–24.
183. Esra Birben, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, and Omer Kalayci. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
184. Pisoschi A. M. and Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2015; 97: 55–74.
185. Poljsak B., Suput D., and Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2013,; 2013 (11)Article ID 956792.
186. Jomova K. and Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011; 83(2-3):65–87.
187. Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C. J., and Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2017;38(7):592–607.
188. Sung Ryul Lee. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 9156285. doi: 10.1155/2018/9156285.
189. Haas K. L. and Franz K. J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemical Reviews.* 2009;109(10):4921–4960.

190. Kochanczyk T., Drozd A. and Krezel A. Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins – insights into zinc regulation. *Metallomics*. 2015;7(2):244–257.
191. Bray T. M. and Bettger W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*. 1990;8(3):281–291.
192. Jarosz M., Olbert M., Wyszogrodzka G., Młyniec K., and Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology*. 2017;25(1):11–24.
193. Efeovbokhan N., Bhattacharya S. K., Ahokas R. A. et al. Zinc and the prooxidant heart failure phenotype. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2014;64(4):393–400.
194. Yuan Y., Niu F., Liu Y., and Lu N. Zinc and its effects on oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*. 2014;35(6):923–928.
195. Clausen, T. McClanahan, S. G. Ji, and J. H. Weiss, Mechanisms of rapid reactive oxygen species generation in response to cytosolic Ca<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> loads in cortical neurons. *PLoS One*. 2013;8(12):1–12.
196. Kim Y. H., Kim E. Y., Gwag B. J., Sohn S., and Koh J. Y. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience*. 1999;89(1):175–182.
197. Koh J. Y., Suh S. W., Gwag B. J., He Y. Y., Hsu C. Y., and Choi D. W. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science*. 1996;272(5264):1013–1016.
198. Eide D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006; 1763(7):711–722.
199. Bouron and Oberwinkler J. Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. *Pflügers Archiv*. 2014;466(3):381–387.
200. Hegetschweiler K., Saltman P., Dalvit C. and Wright P. E, Kinetics and mechanisms of the oxidation of myoglobin by Fe(III) and Cu(II) complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) .Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1987;912(3):384–397.



201. Prasad A. S. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: its role in human health. *Frontiers in Nutrition*.2014;1: 14c.
202. Clemens S, and Ma JF. “Toxic heavy metal and metalloid accumulation in crop plants and foods,” *Annual Review of Plant Biology*, 2016;67(1):489–512.
203. Ludwig J. C., Misiorowski R. L., Chvapil M., and Seymour M. D. Interaction of zinc ions with electron carrying coenzymes NADPH and NADH. *Chemico-Biological Interactions*.1980;30(1):25–34.
204. O'Dell BL. Role of zinc in plasma membrane function. *The Journal of Nutrition*. 2000;130(5):1432–1436
205. Cortese MM, Suschek CV, Wetzell W, Kröncke KD, and Kolb-Bachofen V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 44(12):2002–2012.
206. Ye Song, Jianxun Wang, Xiao-kun Li,Lu Cai. Zinc and the Diabetic Heart. *Biometals*. 2005;18( 4):325–332.
207. Cai L, Li X-K, Song Y, Cherian MG. Essentiality and Toxicology of Zinc and Copper and its chelation therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 2005. 12(23): 2753–2763
208. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans *Free Radic Biol Med*, 2004;37:1182–1190.
209. Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2002;99:16770–16775.
210. Noh SK, Koo SI. Feeding of a low-zinc diet lowers the tissue concentrations of alpha-tocopherol in adult rats *Biol Trace Elem Res*. 2001; 81:153–168.
211. Beattie JH, Kwun IS. Is zinc deficiency a risk factor for atherosclerosis. *Br J Nutr*, 2004. 91:177–181.
212. Morishima I, Okumura K, Matsui H, Kaneko S, Numaguchi Y, KawakamiK, et al. Zinc accumulation in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: effects of melatonin, a cardioprotective antioxidant. *J Pineal Res*, 1999.26: 204–210.

213. Zhao HX, Mold MD, Stenhouse EA, Bird SC, Wright DE, Demaine AG, et al. Drinking water composition and childhood-onset Type 1 diabetes mellitus in Devon and Cornwall, England *Diabet Med*, 2001;18:709–717.
214. Goldberg ED, Eshchenko VA, Bovt VD. The diabetogenic and acidotropic effects of chelators. *Exp Pathol*, 1991;42:59–64.
215. Kechrid Z, Bouzerna N, Zio MS. Effect of low zinc diet on (65) Zn turnover in non-insulin dependent diabetic mice *Diabetes Metab*, 2001;27:580–583.
216. Jayawardena R, Galappaththy P, Ranasinghe P, Malkanthi R. Effects of Zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2012;4(13):8–11.
217. Onur Atakisi, Emine Atakisi, Asim Kart. Effects of dietary zinc and l-arginine supplementation on total antioxidants capacity, lipid peroxidation, nitric oxide, egg weight, and blood biochemical values in japanase qails. *Biological trace element research*. 2009;132(1-3):136–43.
218. Іскра Р.Я., Янович В.Г. Біохімічні механізми дії хрому в організмі людини і тварин. *Укр. біохім. журн*. 2011; 8(5):5–11.
219. Садогурська К.В., Каплуненко В.Г., Чекман І.С. Хром і нанохром: властивості, перспективи застосування у медичній практиці. *Український медичний часопис*. 2014.1(99)- I/II.
220. Нерburn DD, Vincent JB: Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the bloodstream. *J Inorg Biochem*. 2003; 94:86–93.
221. Pechova A, Pavlata L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina*. 2007;52(1):1–18.
222. Іскра РЯ., Влізло ВВ. Біологічна роль хрому в організмі тварин. *Біологія тварин*. 2011;13( 1-2):69–71
223. Стефанов АВ, Деримедведь ЛВ, Чурилова ИВ, и др. Клинико-экспериментальное обоснование применения препаратов супероксид-дисмутазы в медицине. Харьков: Изд-во НФаУ «Золотые страницы», 2004. 288 с.

224. Снітинський В.В., Сологуб Л.І., Антоняк Г.Л., та ін. Біологічна роль хрому в організмі людини і тварин. Укр. біохім. журн. 1999;71(2):5–10.
225. Vincent J. B. Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc. Chem. Res.* 2000;33:503–510.
226. Devis W Lamson, Plaza, Steven. The safety and efficacy of high-dose chromium. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic.* 2002; 7:218–35.
227. Fernando Guerrero-Romero, Martha Rodriguez-Moran Complementary Therapies for Diabetes: The case for chromium, Magnesium, and Antioxidants. *Archives of Medical Research.* 2005;36:250–257
228. Ming-Hoang Lai. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and E supplementation for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 43(3):191–198.
229. National Research Council (NRC). The role of chromium in animal nutrition. National Academy Press. Washington, DC, 1995.
230. Satheesh MA, and Pari L. Antioxidant effect of Boerhavia diffuse L in tissues of alloxan induced diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2004;42:989–992.
231. Suzan M. Mansour, Hala F, Zaki and 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;4(3):186–196.
232. Satheesh MA, and Pari L. Antioxidant effect of Boerhavia diffuse L in tissues of alloxan induced diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2004;42:989–992.
233. Debasis Bagchi, Sidney J. Stohs, Bernard W. Downs, Mihir Bagchi, Harry G. Preuss. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology;* 2002;180(1):5–22.
234. Biedermann KA, Landolph JR. Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis, and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Res.* 1990;50:7835–7842.
235. Porter R, Jáchymová M, Martásek P, Kalyanaraman B, Vásquez-Vivar J. Reductive activation of Cr(VI) by nitric oxide synthase. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(5):834–43

236. Petrilli FL, and De Flora S. Oxidation of inactive trivalent chromium to the mutagenic hexavalent form. *Mutat. Res.* 1978; 58:167–173.
237. Mulyani I, Levina A, and Lay PA. Biomimetic oxidation of chromium(III): Doestheanti diabetic activity of chromium (III) involve carcinogenic chromium(VI). *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004;43:4504–4507.
238. Stocker R, and Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev. Jr.* 2004; 84:1381–1478.
239. Sies H. What is oxidative stress? in *Oxidative Stress and Vascular Disease*. Kluwer Academic, Boston. 2000:1–8.
240. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucosetoxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003;52:581–87.
241. Steen E, Terry BM, Rivera E, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, and de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *J. Alzheimer's Dis.* 2005;7:63–80.
242. Tezuka, M., Momiyama, K., Edano, T., and Okada, S. Protective effect of chromium(III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J. Inorg. Biochem.* 1991;42:1–8.
243. Jain SK, and Kannan K. Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 289:687–691.
244. Vinson JA, Mandarano MA, Shuta DL, Bagchi M, and Bagchi D. Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a niacin-bound chromium in a hamster atherosclerosis model. *Molec. Cell. Biochem.* 2002;240:99–103.
245. Cheng H-H, Lai M-H, Hou W-C, and Huang C-L. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:1385–1389.

246. Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, and Preuss HG. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*. 2002;180:5–22.
247. Hepburn DD, Burney JM, Woski SA, and Vincent JB. The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidized lipids in vivo. *Polyhedron*. 2003;22:455–463.
248. Petit A, Mwale F, Tkaczyk C, Antoniou J, Zukor DJ, and Huk OL. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials*. 2005;26:4416–4422.
249. Althuis MD, Jordan NE, Ludington EA, and Wittes JT. Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: A meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002;76:148–155.
250. Pittler MH, Stevinson C, and Ernst E. Chromium picolinate for reducing body weight: Meta-analysis of randomized trials. *Int. J. Obes.* 2003;27:522–529.
251. Vincent JB. Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proc. Nutr. Soc.* 2004;63:41–47.
252. Cefalu WT, and Hu FB. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:2741–2751.
253. Vincent JB. Recent developments in the biochemistry of chromium(III). *Biol. Trace Elem. Res.* 2004; 99:1–16.
254. Borguet F, Cornelis R, Delanghe J, Lambert M-C, and Lameire N. Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin. Chim.* 1995;238:71–84.
255. Clodfelder BJ, Upchurch RG, and Vincent JB. A comparison of the insulinsensitive transport of chromium in healthy and model diabetic rats. *J. Inorg. Biochem.* 2004;98:522–533.
256. Kareus SA, Kelley C, Walton HS, and Sinclair PR. Release of Cr(III) from Cr(III) picolinate upon metabolic activation. *J. Hazard. Mater.* 2001;84:163–174.

257. Yinan Hua, Suzanne Clark, Jun Ren, and Nair Sreejayan. Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *J Nutr Biochem*. 2012;23(4):313–319.
258. Mulyani I. In vitro biological activities and chemistry of Cr(III) dietary supplements. Ph D Thesis, The University of Sydney. 2006.
259. Wongseelashote O, Daly MA, and Frankel EH. High insulin requirement versus high chromium requirement in patients nourished with total parenteral nutrition. *Nutrition*. 2004;20: 318–320.
260. Sugden KD, and Stearns DM. The role of chromium(V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol*. 2000;19:215–230.
261. Dillon CT, Lay PA, Bonin AM, Dixon NE, and SulfabY. DNA interactions and bacterial mutagenicity of some chromium(III) imine complexes and their chromium(V) analogues. Evidence for chromium(V) intermediates in the genotoxicity of chromium(III). *Aust. J. Chem*. 2000;53:411–424.
262. Sun, Y. J., Mallya, K., Ramirez, J., and Vincent, J. B. The biomimetic  $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  decreases plasma cholesterol and triglycerides in rats: Towards chromium-containing therapeutics. *J. Biol. Inorg. Chem*. 1999;4:838–845.
263. Sun, Y.J., Clodfelder, B.J., Shute, A.A., Irvin, T., and Vincent, J.B. The biomimetic  $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  decreases plasma insulin, cholesterol, and triglycerides in healthy and type II diabetic rats but not type I diabetic rats. *J. Biol. Inorg. Chem*. 2002;7:852–862.
264. Goffin V, and Kelly PA. Protein phosphorylation and protein-protein interactions in Hormone Signaling. Kluwer Academic Publishers, Boston MA. 2002:3–20.
265. Zhao Y, and Zhang, ZY. Control of signaling by tyrosine phosphatases in Hormone signaling. Kluwer Academic Publishers, Boston MA. 2002:21–36.
266. Le Roith D, Quon MJ, and Zick Y. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors and signaling pathways: Similarities and differences in Hormone

- Signaling (Goffin V, and Kelly PA, eds.) Kluwer Academic Publishers, Boston MA. 2002: 81–100.
267. Vincent JB. Recent developments in the biochemistry of chromium(III). *Biol. Trace Elem. Res.* 2004;99:1–16.
268. Islam S, & Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study. *Pharmacology*; 2007;79:243–249.
269. Islam S, & Loots D.T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 2009;31(4):249–261.
270. Srinivasan K, & Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview *Indian J Med Res* 2007 March; 125:451–472.
271. Грицюк М. І., Бойчук Т. М., Петришен О. І. Порівняльна характеристика експериментальних моделей цукрового діабету. *Світ медицини та біології.* 2014;2(44):199–203
272. Спасов А.А, Воронкова М.П., Снигур Г.Л. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина.* 2011;3:12–18.
273. Rees D. A., Alcolado J.C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2005;22(4):359–370.
274. Борисевич В.Б., Борисевич Б.В., Хомин Н.М. Здобутки нано-технології в лікуванні та профілактиці хвороб тварин. *Нановетеринарія (впровадження інноваційних технологій).* Київ: ДІА; 2009. 184с.
275. Косінов М. В., Каплуненко В. Г. Патент України на корисну модель № 29856 UA. МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів». Оубл. 25.01.2008. Бюл. № 2/2008.
276. Довгань Н.Я., редактор. *Методики досліджень з фізіології і біохімії сільськогосподарських тварин.* Львів: ВКП "ВМС". 1998. 131с.
277. Влизло В.В., Меньшиков В.В. *Лабораторные методы исследования в клинике (Справочник).* Медицина Москва, 1987. 368с.
278. Меньшиков В. В. *Лабораторные методы исследования в клинике (Справочник).* Медицина Москва; 1987. 368с.

279. Влізло В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів. Сполом.2012;
280. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. *Adv. Clin. Chem.*, 1983;23:199–257.
281. Evans GO. *Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers*. CRC Press, 2009. 368p.
282. Снитинский В.В., Янович В.Г. Исследование углеводно-энергетического обмена у сельскохозяйственных животных. Методические рекомендации. Львов. 1984. 28с.
283. Гончар МВ, Смуток ОВ, Осьмак ГС. Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах. Патент України 45283: 10/11/2009, Бюл. № 21.
284. Левченко ВІ, Влізло ВВ, Кондрахін ІІ, та ін. Ветеринарна клінічна біохімія. Підручник. Біла Церква, БГАУ, 2002. 400с.
285. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RI.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 1951.193(1):265–275.
286. Мирончик ВВ. Способ определения содержания гидроперекисей липидов в биологических тканях. Авторское свидетельство №1084681 СССР, МКИ G № 33/48. (СССР). №3468369/2813; заявл. 08.07.82; опубл. 07.04.84. Бюл. №1.
287. Коробейникова ЭН. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб. Дело*. 1989;7:8–9.
288. Чевари С, Андял Т, Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. *Лабораторное дело*. 1991;10:9–13.
289. Королюк МА, Иванова ЛК, Майорова ИГ, Токарева ВА. Метод определения активности каталазы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1988;4:44–47.
290. Моин ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. Дело*. 1986;12:724–72.



291. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. In *Methods in enzymology*. 1985;113:484–490.
292. Батлер О, Дюбра О. Методика определения уровня восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах крови (по принципу Батлер О. Дюбон Б. Келли, 1963): методические рекомендации по дифференциальной диагностике различных форм ишемической болезни сердца с использованием определения компонентов глутатионовой противоперекисной каталитической системы в эритроцитах крови. Одеса, 1982;16–20.
293. Сумбаев ВВ., Ясинская И. М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс. *Соврем. пробл. токсикол.* 2000;3:3–7.
294. Сибірна НО, Маєвська ОМ, Барська МЛ. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу: Навч.-метод. посібник. Львів: Видавн. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2006.60с.
295. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, et al. Zinc and human health: an update. *Arch. Toxicol.* 2012;86(4):521–534.
296. Agre P., Parker J.C. Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications. *Hematology*. New York: CRC Press.1989.733.
297. Anderson R.A. Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: Chromium. *Journal of American College Nutrition.* 1997; 16:404–410.
298. Nakayama Y., Kinoshita A., Tomita M. Dynamic simulation of red blood cell metabolism and its application to the analysis of a pathological condition. *Theoretical Biology and Medical Modelling.*2005:2–18.
299. Kakkar R. Kalra J.,Mantha S., Prasad V, K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.* 1995; 151(2):113–119.
300. Іванушко ЯГ, Гриневич Ю., Липська АІ. Вплив рентгенівського випромінювання на ферменти антиокиснювального захисту печінки щурів. *Ядерна фізика та енергетика*, 2009;10(1):76–79.

301. Мерецький В. М. Порушення ліпідного та вуглеводного обміну і методи їх корекції при експериментальному цукровому діабеті. Медична хімія. 2007;9(3):83–86
302. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, и его физио-логические и патофизиологические свойства. Терап.архив.2005;1:82–87.
303. Richa Shrivastava RK, Upreti PK, Seth UC. Chaturvedi Effects of chromium on the immune system. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2002;34:1–7.
304. Іскра Р.Я., Слівінська О.М. Вплив цитрату хрому на вуглеводний обмін у крові щурів за стрептозотоцин індукованого діабету. Медична хімія. 2014;3(60):16–19.
305. Іскра Р. Я., Слівінська О. М., Шатинська О. А., Сварчевська О. З., Сеньків О. М., Пилипець А. З. Метаболічні процеси у печінці щурів за експериментального діабету та вплив цитрату хрому. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015;1266:161–166.
306. Oksana Slivinska, Oksana Senkiv, Ruslana Iskra Antioxydant system in rats' liver and skeletal muscles during experimentally-induced diabetes and its correction with chromium citrate. «British Journal of Science and Education» 2015;7:1119–1126.
307. Іскра Р.Я., Слівінська О.М. Дія хром цитрату на про/антиоксидантний статус підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету. Вісник Львівського університету імені І.Я.Франка 2015;70:25–30.
308. Слівінська О.М., Іскра Р.Я. Коригувальний вплив цитратів хрому і цинку NO-синтазної активності еритроцитів щурів із стрептозотоциновим діабетом. Biol. Tvarin. 2020;22(2):65–70.
309. Слівінська О.М., Іскра Р.Я. Активність системи антиоксидантного захисту в крові щурів із експериментально індукованим діабетом і за впливу цитрату хрому. Тези IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (16-17 жовтня 2014 року, г. Харків).

310. Іскра Р.Я., Слівінська О.М., Сеньків О.М. Вплив хром цитрату на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в скелетних м'язах щурів за експериментально індукованого діабету. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», 2-3 жовтня 2014 р., Львів. Біологія тварин. 2014.16(3):174.
311. Іскра Р.Я., Сварчевська О.З., Салига Н.О., Слівінська О.М. Біохімічні процеси в організмі щурів за різних доз хрому(III) в раціоні. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу 6-10 жовтня 2014 р., м. Київ. Український біохімічний журнал 2014;86(5 ):152–153.
312. Іскра Р.Я., Слівінська О.М., Салига Н.О., Сеньків О.М.. Вплив хром цитрату на показники вуглеводного обміну та антиоксидантної системи в еритроцитах та гепатоцитах щурів за експериментально індукованого діабету. Матеріали міжнародної наукової конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем», приуроченої до 70-ліття біологічного факультету та 230-ліття фізіології у Львівському університеті. Львів, 2014;42–43.
313. Слівінська О. М., Шатинська О. А., Іскра Р. Я. Оксидативно-нітративний стрес у щурів з експериментально-індукованим діабетом та його корекція цитратом хрому: Матеріали конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015»; 59.
314. Lee A.Y., Chung S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. The FASEB Journal. 1999;13( 1):23–30.
315. Seven A, Guzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayirli M, Yiğit G, Burçak G. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME in streptozotocin induced diabetic rats: impacts on oxidative stress. Tohoku J. Exp. Med. 2003;199(4):205–210.
316. Li H, Raman CS, Glaser CB, Blasko E, Young TA, Parkinson JF, Whitlow M, Poulos TL. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison

- with endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:21276–21284.
317. Слівінська О.М., Сеньків О.М., Іскра Р.Я. Антиоксидантна система у скелетних м'язах та крові щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2016(26):5–10.
318. Iskra R. Ya., Slivinska O. M., Klymets H. V. Carbohydrate metabolism in blood and liver of rats with experimental diabetes and its correction by zinc citrate. *The Animal Biology*. 2016;18( 3):46–52.
319. Слівінська О.М. Вплив цитрату цинку на антиоксидантний захист у печінці та підшлунковій залозі щурів за експериментального діабету. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017;4(6):189–193.
320. Слівінська О.М., Шатинська О.А. Вплив цитратів цинку і магнію на вуглеводний обмін у крові та тканинах щурів з експериментальним цукровим діабетом. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: біологія» .Київ. 2015; 182–184 .
321. Климець Г. В., Слівінська О. М., Іскра Р. Я. Вплив цитрату цинку на вуглеводний обмін в організмі щурів з експериментальним цукровим діабетом. Тези на конференцію «Актуальні проблеми фізіології тварин» Одеса.
322. Iskra Ruslana, Slivinska Oksana. Influence of Zinc Citrate on Oxidative and Nitrative Stress in rats' organism with experimentally induced diabetes mellitus. Joint Annual Meeting of the German Society for Minerals and Trace Elements (GMS) with Zink-UK. (September 28–30, 2017, Achen, Germany) *Zinc and others transition Metals in the health and Disease*. 2017;55.
323. Іскра Р. Я., Слівінська О. М., Шатинська О. А. та інші. Живлення тварин та фізіологі-біохімічні процеси в організмі за дії цитратів мікроелементів: методичні рекомендації. Львів. 2016;27.

324. Дербак М.А., Сіксаї Л.Т., Пічкарь Й.І. Рівні с-пептиду у хворих на цукровий діабет 2 типу у поєднанні з хронічним гепатитом. Молодий вчений, 2015;3(18):122-125.
325. Slivinska O. M., Iskra R. J. A complex influence of chromium and zinc citrates on antioxidant defense system in rats' organism with an experimentally induced diabetes mellitus. Медична та клінічна хімія. 2017;19(1):31-39.
326. Слівінська О., Іскра Р., Приймич В. Вплив цитратів хрому та цинку на вміст мікроелементів та вуглеводний обмін в організмі щурів з експериментальним діабетом. Матеріали XVII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених «Молоді учені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини». 2018р. Львів.
327. Слівінська О. М., Іскра Р. Я., Шатинська О. А. Спосіб профілактики цукрового діабету при комплексному використанні цитратів хрому та цинку: пат. 121254, Україна. МПК А61К 33/00, А61Р 3/10 (2006.01); заявл. 26.06.2017, опубл. 27.11.2017, Бюл. № 22.
328. Amin Al-awar, Krisztina Kupai, Médea Veszeka, Gergő Szűcs, Zouhair Attieh, Zsolt Murlasits, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. J Diabetes Res. 2016;2016:9051426. doi:10.1155/2016/9051426.
329. Кузнєцова М.Ю., Галєнова Т.І., Савчук О.М, Верещака В.В., Остапченк Л.І. Вуглеводний обмін при цукровому діабеті 1-го типу у щурів за умов застосування водного екстракту лущиння квасолі звичайної. Фізіол. журн. 2015;61(6):96–103.
330. Горшунська М.Ю. Оксидативний стрес у хворих на цукровий діабет 2 типу: зв'язок з характеристиками розвитку, прогресування та ускладнень. Проблеми ендокринної патології. 2012; 3:113–124.
331. Brownlee M. Negative consequences of glycation. Metabolism. 2000;49: 9–13.
332. Wautier MP, Chappey O, Corda S. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. Am. J. Physiol. 2001;280:685–694.

333. Forbes JM., Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57:1446–1454.
334. Khan ZA. Cellular signalling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. Khan ZA, Chakrabarti S. *Exp. Diab. Res.* 2007. 2007, 12 p. Article ID 31867.
335. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007;39:44–84.
336. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656–1662.
337. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J. Lab. Clin. Med.* 2003;142:172–177.
338. Sivitz WI., Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antiox. Redox. Signal.* 2010; 12(4):537–577.
339. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216–226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.
340. Masoom MM, Albiladi F. C-Peptide as a Marker for Diabetic Nephropathy. *Intern Med* 2017;7(3): 245. doi:10.4172/2165-8048.1000245
341. Кузишин ОВ, Ковалишин НВ, Алмашина ХВ. Біохемія цукрового діабету: 1 Теоретична частина(огляд). *Медична хімія*. 2010.
342. Agre P, Parker JC. Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications. *Hematology*. New York: CRC Press, 1989.733 .
343. Кузишин ОВ, Ковалишин НВ, Алмашина ХВ. Біохемія цукрового діабету: 1. Теоретична частина (огляд). *Вісник Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Серія «Хімія»*. 2010;(9):74–115
344. Старикович Л., Пермякова Н, Верніковська Я. Активність та ізозимний спектр лактатдегідрогенази еритроцитів щурів за умов дії іонізуючого

- випромінювання низької інтенсивності. Вісник Львів. університету. Серія біологічна. 2002; 28: 51–57.
345. Defronzo R.A., Ferrannini E., Zimmet P., Alberti G. International Textbook of Diabetes Mellitus. Chichester: John Wiley. 2015.1-2.1240 .
346. Мокрий ВЯ, Зяблицев СВ, Борис РМ. Порухення системи перекисного окислення ліпідів при цукровому діабеті 2-го типу. Международный эндокринологический журнал. 2015;7(71):41–44.
347. Попова ТН, Агарков АА, Вережкин АН. Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2-го типа и введении эпифамина. Экспериментальные статьи. 2013;5(4):129–133.
348. Некрасов ЭВ. Методы анализа перекисного окисления липидов в медико-биологических исследованиях. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012; 6:98–103.
349. Коровина НА, Захарова ИН, Обычная ЕГ. Применение антиоксидантов в педиатрической практике. [Электронный ресурс] [http: media consilium](http://media.consilium) 03.09.2004;
350. Суханова ГА, Серебров ВЮ. Биохимия клетки. Томск: Чародей. 2006:91–142.
351. Занозина ОВ. Роль окислительного стресса в развитии и прогрессировании поздних осложнений сахарного диабета 2-го типа. Возможности антиоксидантной терапии. Международный эндокринологический журнал. 2010; 7(31):15–19.
352. Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? Curr. Diab. Rep. 2014;14(6): 492. doi: 10.1007/ s11892-014-0492-2.
353. Satheesh MA, and Pari L. Antioxidant effect of Boerhavia diffusa L in tissues of alloxan induced diabetic rats. Indian J.Exp. Biol. 2004;42:989-992.
354. Krebs NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. J. Nutr. 2000;13:1374–1377.

355. Dincer Y, Alademir ZI, Ikova H, Akcay T. Susceptibility to glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: Effect of glycemic control. *Clin. Biochem.* 2002;35:297–301.
356. Кулинский В.И., Колисниченко Л.С. Обмен глутатиона. *Успехи биол. химии.* 1990;31:157–179.
357. Miriam M. Cortese-Krott and Malte Kelm. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014; 2:251–258. doi:10.1016/j.redox. 2013.12.027.
358. Sessa WC. eNOS at a glance. *J. Cell Sci.* 2004;117:2427–2429.
359. Van den Oever I., Raterman H.G., Nurmohamed M.T., Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation.* 2010. Published online, 10.1155/2010/792393
360. Панчишин О.Б., Панасюк Н.Б., Білецька Л.П., Склярів О.Я. Зміни активності NO-синтаз та аргініну у тканині підшлункової залози при введенні L-аргініну або аміногуанідину за умов стрептозотоци-індукованої гіперглікемії. *Таврійський медико-біологічний вісник.* 2012;15(3):260–262.
361. Doddigarla Z, Parwez I, Abidi S, Jamal A. Effect of chromium picolinate and melatonin either in single or in a combination in alloxan induced male wistar rats. *J. Biomedical Sci.* 2016, 6:1. doi:10.21767/2254-609X.100051
362. Owusu BY, Stapley R, Honavar J, Patel RP. Effects of erythrocyte aging on nitric oxide and nitrite metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2013;1198–1208.
363. Панченко ЕП. Ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет – коварный тандем. *Сердце.* 2004;3,1(13): 9–12.
364. Andreini C, Bertini I, and Rosato A. Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts of Chemical Research.* 2009;42(10):1471–1479.
365. Алтунина НВ, Бондарчук ОМ. Цинк: клініко-біохімічні паралелі (огляд літератури). *Ендокринологія,* 2013; 18( 4):71–77.
366. Vincent JB. *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III).* Department of Chemistry The University of Alabama Tuscaloosa, USA. 2007. 277 p.



367. Новинюк ЛВ. Цитраты – безопасные нутриенты. Пищевые ингредиенты: сырье и добавки. 2009;1:70–71.
368. Chen WY, Chen CJ, Liao JW. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis. *Life Sciences*. 2009; 84:606–614.
369. Турпаев КТ. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. *Биохимия*. 2002;67(3):339–352.
370. Capdor J, Foster M, Petocz P, Samman S. Zinc and glycemic control: a meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *J Trace Elem Med Biol*. 2013;27:137–142.
371. Foster M, Samman S. Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:1549–1573.
372. Ruz M, Carrasco F, Rojas P, Codoceo J, Inostroza J, Basfi-fer K, Valencia A, Vásquez K, Galgani J, Pérez A, et al. Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes. *Food Nutr Bull*. 2013;34:215–221.
373. Zhu K, Nie S, Li C, Huang J, Hu X, Li W, Gong D, Xie M. Antidiabetic and pancreas-protective effects of zinc threoninate chelate in diabetic rats may be associated with its antioxidative stress ability. *Biol Trace Elem Res*. 2013;153:291–298.
374. Powell SR. Antioxidant properties of zinc. *J Nutr*. 2000;130: 1447–1454.
375. Karatug A, Kaptan E, Bolkent S, Mutlu O, Yanardag R. Alterations in kidney tissue following zinc supplementation to STZ-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2013;27:52–57.
376. Oteiza PI. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:1748–1759.
377. Li H, Raman CS, Glaser CB, Blasko E, Young TA, Parkinson JF, Whitlow M, Poulos TL. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:21276-21284.

378. Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA. Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26:704–713.
379. Heltianu C, Guja C. Role of nitric oxide synthase family in diabetic neuropathy. *J Diabetes Metab.* 2011; S5: 002. doi:10.4172/2155-6156.S5-002
380. Mitchell DA, Erwin PA, Michel T, Marletta MA. S-nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 2005;44:4636–4647.
381. Niedowicz DM, Daleke D. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys.* 2005;289–330.
382. Yamaoka J, Kume T, Akaike A, Miyachi Y. Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon- $\gamma$  or tumor necrosis factor- $\alpha$  in murine keratinocytes. *Journal of Dermatological Science.* 2000; 23:27-35.
383. Priyanga Ranasinghe, Shehani Pigera, Priyadarshani Galappatthy, Prasad Katulanda, and Godwin R. Constantine. Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. *Daru.* 2015; 23(1):44.
384. Гула Н.М., Горідько Т.М., Стогній Н.А., та ін. Протекторний вплив N-стеароїлетаноламіну за гострої алкогольної інтоксикації у щурів. *Український біохімічний журнал.* 2010;82(2):42–52.
385. Bardsley, Joan K, Want, et al. Overview of diabetes. *Critical care nursing quarterly.* 2004;27(2):106–112.

## ДОДАТОК А

### Список публікацій здобувача за темою дисертації.

1. **Слівінська О. М.**, Сеньків О. М., Іскра Р. Я. Антиоксидантна система у скелетних м'язах та крові щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія. 2016; 26: 5-10.
2. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А., Сварчевська О. З., Сеньків О. М., Пилипець А. З. Метаболічні процеси у печінці щурів за експериментального діабету та вплив цитрату хрому. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015; 12: 161-166.
3. Iskra R. Ya., **Slivinska O. M.**, Klymets H. V. Carbohydrate metabolism in blood and liver of rats with experimental diabetes and its correction by zinc citrate. The Animal Biology. 2016; 18(3): 46-52.
4. **Slivinska O. M.**, Iskra R. Ja. A complex influence of chromium and zinc citrates on antioxidant defense system in rats' organism with an experimentally induced diabetes mellitus. Медична та клінічна хімія. 2017; 19(1): 31-39.
5. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.** Вплив цитрату хрому на вуглеводний обмін у крові щурів за стрептозотонін індукованого діабету. Медична хімія. 2014; 3(60): 16-19.
6. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.** Дія хром цитрату на про/антиоксидантний статус підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015; 70: 25-30.
7. **Слівінська О. М.** Вплив цитрату цинку на антиоксидантний захист у печінці та підшлунковій залозі щурів за експериментального діабету. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017; 4(6): 189-193.

8. **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я. Коригувальний вплив цитратів хрому і цинку на NO-синтазну активність еритроцитів щурів із стрептозотоциновим діабетом. *The Animal Biology*. 2020; 22(2): 65-70.
9. **Slivinska O.**, Senkiv O., Iskra R. Antioxydant system in rats' liver and skeletal muscles during experimentally-induced diabetes and its correction with chromium citrate. *British Journal of Science and Education*. 2015; 1(7): 1119-1125.
10. **Slivinska O. M.**, Iskra R. Ya. Scientific developments of Ukraine and EU in the area of natural sciences: Collective monograph. P. 2. Riga: Izdevniecība «Baltija Publishing»; 2020. Antioxydant system in rats' liver and skeletal muscles during experimentally-induced diabetes and its correction with chromium and zinc citrates: 649-663.
11. Спосіб профілактики цукрового діабету при комплексному використанні цитратів хрому та цинку: пат. 121254, Україна / **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я., Шатинська О. А. МПК А61К 33/00, А61Р 3/10 (2006.01); заявл. 26.06.2017, опубл. 27.11.2017, Бюл. № 22.
12. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А. Салига Н. О., Сварчевська О. З., Бучко О. М., Пилипець А. З., Сеньків О. М., Приймич Н. І. Живлення тварин та фізіологі-біохімічні процеси в організмі за дії цитратів мікроелементів: методичні рекомендації. Львів; 2016. 27.
13. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Сушко О. О., Климець Г. В., Котик Б. І., Любас Н. М. Застосування цитратів мінеральних елементів у біології та медицині: методичні рекомендації. Львів; 2020. 26.
14. **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я. Активність системи антиоксидантного захисту в крові щурів із експериментально індукованим діабетом і за впливу цитрату хрому. Тези IV Міжнародної науково-практичної конференції: Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології, Харків, 2014. 175.
15. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Сеньків О. М. Вплив хром цитрату на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в скелетних м'язах щурів за експериментально індукованого діабету. Матеріали міжнародної науково-

- практичної конференції: Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини, м. Львів, Біологія тварин. 2014; 16(3): 174.
16. Іскра Р. Я., Сварчевська О. З., Салига Н. О., **Слівінська О. М.** Біохімічні процеси в організмі щурів за різних доз хрому(III) в раціоні. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, м. Київ, Український біохімічний журнал. 2014; 86(5): 152-153.
  17. Іскра Р. Я., **Слівінська О. М.**, Салига Н. О., Сеньків О. М.. Вплив хром цитрату на показники вуглеводного обміну та антиоксидантної системи в еритроцитах та гепатоцитах щурів за експериментально індукованого діабету. Матеріали міжнародної наукової конференції: Механізми функціонування фізіологічних систем, приуроченої до 70-ліття біологічного факультету та 230-ліття фізіології у Львівському університеті, Львів; 2014: 42-43.
  18. **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А., Іскра Р. Я. Оксидативно-нітративний стрес у щурів з експериментально-індукованим діабетом та його корекція цитратом хрому: Матеріали конференції-конкурсу молодих учених: Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015, Київ, 2015: 59.
  19. **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А. Вплив цитратів цинку і магнію на вуглеводний обмін у крові та тканинах щурів з експериментальним цукровим діабетом. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених: Шевченківська весна: біологія, Київ; 2015: 182-184.
  20. Климець Г. В., **Слівінська О. М.**, Іскра Р. Я. Вплив цитрату цинку на вуглеводний обмін в організмі щурів з експериментальним цукровим діабетом. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції: Актуальні проблеми фізіології тварин, м. Одеса, 2016: 26-29.
  21. Iskra R., **Slivinska O.** Influence of Zinc Citrate on Oxidative and Nitrative Stress in rats' organism with experimentally induced diabetes mellitus. Joint Annual Meeting of the German Society for Minerals and Trace Elements with Zink-UK. Achen; 2017:55.

22. Іскра Р. Я., Понкало Л. І., Сушко О. О., **Слівінська О. М.**, Шатинська О. А. Вплив цитратів ванадію, цинку та магнію на стан прооксидантної системи підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету. Міжнародна конференція: Бабенківські читання, Івано-Франківський національний медичний університет; 2017: 49.
23. **Слівінська О.**, Іскра Р., Приймич В. Вплив цитратів хрому та цинку на вміст мікроелементів та вуглеводний обмін в організмі щурів з експериментальним діабетом. Матеріали XVII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених: Молоді учені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини, Львів. Біологія тварин. 2018; 20(4): 136.

## ДОДАТОК Б



УКРАЇНА  
ЛЬВІВСЬКА ОБЛАСНА РАДА  
УПРАВЛІННЯ МАЙНОМ СПІЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕПАРТАМЕНТ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я  
ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСНОЇ ДЕРЖАВНОЇ АДМІНІСТРАЦІЇ  
ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ КОМУНАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСНОЇ РАДИ  
«ЛЬВІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМЕНІ АНДРЕЯ КРУПІНСЬКОГО»

79000, м. Львів, вул. П. Дорошенка, 70 тел.: (032) 244-57-52, 261-50-48, e-mail: ldmk@ukr.net

25.08.2020 № 01-35/331



«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Ректор ВНЗ ЛОР  
Львівська медична академія  
імені Андрія Крупинського»,  
д.м.н., професор

Кривко Ю.Я.  
2020 р.

### КАРТКА ЗВОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

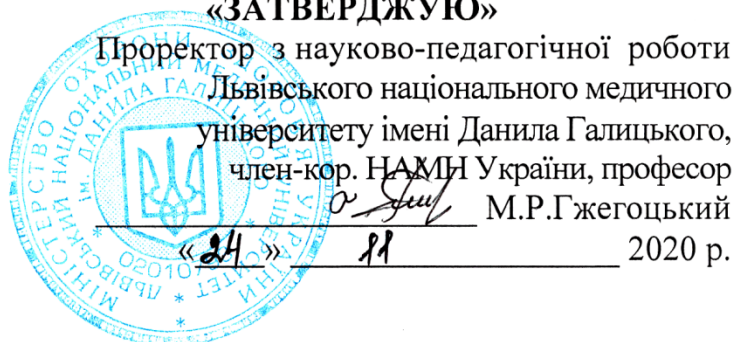
Викладені результати досліджень у дисертаційній роботі Слівінської Оксани Миколаївни «Вуглеводний обмін і антиоксидантна система в щурів з експериментальним цукровим діабетом та їх корекція цитратами хрому і цинку», є корисними для вивчення патогенетичних механізмів розвитку цукрового діабету і запроваджені для використання у навчальному процесі кафедри лабораторної медицини Львівської медичної академії імені Андрія Крупинського при викладанні нормативних курсів «Органічна хімія із основами біохімії», «Біохімія», «Біологічна хімія з біохімічними методами дослідження», «Біологічна та клінічна хімія». Визнано, що результати цієї роботи мають науково-теоретичну та методичну цінність для біології та біохімії, зокрема, і є актуальними для підготовки фахівців у практичній охороні здоров'я.

Проректор з наукової роботи  
ВНЗ ЛОР  
«Львівська медична академія  
імені Андрія Крупинського»,  
канд.філол.наук, доцент

Стоколос-Ворончук О.О.

## ДОДАТОК В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної роботи  
Львівського національного медичного  
університету імені Данила Галицького,  
член-кор. НАМН України, професор  
М.Р.Гжегоцький  
«24» 11 2020 р.

### КАРТКА ЗВОРТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Результати дослідження викладені у дисертаційній роботі Слівінської Оксани Миколаївни « Вуглеводний обмін і антиоксидантна система в щурів з експериментальним цукровим діабетом та їх корекція цитратами хрому і цинку» є корисним для вивчення механізмів розвитку цукрового діабету і прийнятні для використання у навчальному процесі кафедри патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при викладанні тем «Порушення вуглеводного обміну», «Патофізіологія ендокринної системи».

Матеріали кандидатської дисертаційної роботи Слівінської Оксани Миколаївни розглянуто на засіданні кафедри патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та визнано, що результати цієї роботи є актуальними, мають науково-практичну та методичну цінність.

Джерело інформації:

1. Slivinska O. M., Iskra R. J. A complex influence of chromium and zinc citrates on antioxidant defense system in rats' organism with an experimentally induced diabetes mellitus. Медична та клінічна хімія. 2017;19(1): 31-39.
2. Слівінська О.М. Вплив цитрату цинку на антиоксидантний захист у печінці та підшлунковій залозі щурів за експериментального діабету. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017;4(6):189-193.
3. R. Iskra, O. Sushko, A. Pylypets, O. Slivinska. Effect of chromium citrate on lipid composition in blood plasma of rats with experimental diabetes. Біологічні студії. 2018; 12(3-4): 35-46

Завідувач кафедри патологічної фізіології  
Львівського національного медичного  
університету імені Данила Галицького  
доктор медичних наук, професор

М.С. Перегада



