

### Сведения об авторах

Т.И. Борзунова\* – студентка медико-профилактического факультета

Н.С. Фертикова – старший преподаватель

Н.А. Кольберг – директор Единого лабораторного комплекса ФГБОУ ВО «УРГЭУ», кандидат ветеринарных наук, доцент

### Information about the authors

T.I. Borzunova\* – student of the Faculty of Medicine and Prevention

N.S. Fertikova – Senior Lecturer

N.A. Kolberg – Director of the Unified laboratory complex of USUE, Candidate of Sciences (Veterinary medicine), Associate Professor

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

tan.borzunova@gmail.com

УДК: 001.891.53

## ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТА ЦИНКА НА ИЗМЕНЕНИЕ РЯДА ПАРАМЕТРОВ В КРОВИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Винокуров Михаил Михайлович, Дедов Ярослав Игоревич, Селиванова Наталия

Владимировна, Епринцев Александр Трофимович

Кафедра биохимии и физиологии клетки

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Минздрава России

Воронеж, Россия

### Аннотация

**Введение.** В последнее время стало появляется много работ, связанных с изучением метаболизма микроэлементов у пациентов с сахарным диабетом. Одним из часто наблюдаемых изменений является дефицит цинка, который очень тесно связан с метаболизмом углеводов. **Цель исследования** – показать влияние сульфата цинка на некоторые биохимические показатели крови на фоне аллоксановой интоксикации. **Материал и методы.** В качестве объекта исследования были взяты самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L. линии Wistar). В качестве препарата, содержащего сульфат цинка, брали шипучие таблетки «Цинкит». В исследовании принимали участие 3 группы животных (n=24). Биохимические параметры (Общий  $Zn^{2+}$ , общий  $Ca^{2+}$ , гликированный гемоглобин, пируват, АлАТ, ЛДГ, общий холестерин) измеряли спектрофотометрически с использованием наборов «Витал» и «Абрис+». **Результаты.** Было показано, что у крыс с стойкой гипергликемией наблюдалось повышение уровня глюкозы, гликированного гемоглобина, общего холестерина, общего цинка, активность ЛДГ, в то время как уровень кальция понижался. Уровни пирувата и АлАТ оставались в пределах нормы. У группы крыс, принимавших сульфат цинка на фоне развития патологии, были выявлены следующие изменения: уровень глюкозы и гликированного гемоглобина, общий  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  снизились (относительно животных с аллоксановой интоксикацией), тогда как на концентрацию пирувата, общего холестерина и значения активностей ЛДГ и АлАТ ионы цинка влияния не оказали. **Выводы.** Сульфат цинка оказывает положительное влияние на контроль глюкозы, а также уменьшает уровень гликозилирования. Помимо этого, он частично уменьшает уровень общего холестерина. Не оказывает влияние на активности ферментов ЛДГ и АлАТ, а также уровень общего  $Ca^{2+}$ .

**Ключевые слова:** диабет, аллоксан, цинк, гликемия.

## THE EFFECT OF ZINC SULFATE ON CHANGES IN A NUMBER OF PARAMETERS IN THE BLOOD OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES

Vinokurov Mikhail Mikhailovich, Dedov Yaroslav Igorevich, Selivanova Nataliya Vladimirovna,

Eprintsev Alexandr Trofimovich

Department of Biochemistry and Cell Physiology

Voronezh State University

Voronezh, Russia

### Abstract

**Introduction.** Recently, many works have appeared related to the study of the metabolism of microelements in patients with diabetes mellitus. One of the frequently observed changes is zinc deficiency, which is very closely related to carbohydrate metabolism. **The aim of the study** is to show the effect of zinc sulfate on some biochemical blood parameters against the background of alloxan intoxication. **Material and methods.** Male laboratory rats (*Rattus norvegicus* L. Wistar line) were taken as the object of the study. The preparation containing zinc sulfate was «Zinkit» effervescent tablets. The study included sections of the 3rd group of animals (n=24). Biochemical parameters (Total  $Zn^{2+}$ ,

total Ca<sup>2+</sup>, glycated hemoglobin, pyruvate, ALT, LDH, total cholesterol) were measured spectrophotometrically using the «Vital» and «Abris+» kits. **Results.** It was shown that in rats with persistent hyperglycemia there was an increase in the levels of glucose, glycated hemoglobin, total cholesterol, total zinc, and LDH activity, while calcium levels decreased. Pyruvate and ALT levels remained within normal limits. In a group of rats taking zinc sulfate, the following changes were revealed against the background of the development of pathology: the level of glucose and glycated hemoglobin, total Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> decreased (relative to animals with alloxan intoxication), while the concentration of pyruvate, total cholesterol and the values of LDH and ALT activities Zinc ions had no effect. **Conclusion.** Zinc sulfate has a positive effect on glucose control and also reduces glycosylation. In addition, it partially reduces total cholesterol levels. Does not affect the activities of the enzymes LDH and ALT, as well as the level of total Ca<sup>2+</sup>.

**Keywords:** diabetes, alloxan, zinc, glycemia.

## ВВЕДЕНИЕ

Цинк является одним из важнейших микроэлементов в организме человека и имеет тесную связь с рядом патологических состояний, особенно сопровождающихся нарушением углеводного обмена. Если провести корреляцию между клиническими проявлениями дефицита цинка и диабетическими осложнениями, то можно заметить некоторую взаимосвязь в патофизиологическом процессе, например, ослабление иммунитета, приводившее к более серьезному течению инфекционных заболеваний, опухолей у диабетиков. Также известно, что дефицит Zn<sup>2+</sup> сопровождается снижением активности карбоксипептидазы, преобразующей молекулу проинсулина в инсулин, вдвое, по сравнению с нормой. Помимо его участия в синтезе и поддержании структуры молекулы инсулина, он также может оказывать инсулиноподобное действие на клетки. Кроме того, было обнаружено, что у лабораторных животных, на фоне развития экспериментального диабета, наблюдалось нарушение работы транспортеров цинка в β-клетках.

Учитывая высокую распространенность СД и его осложнений, возникающих на фоне перестройки биохимических путей, а также тот факт, что Zn<sup>2+</sup> важен для нескольких органических функций, которые нарушены у людей с диабетом, добавление этого питательного микроэлемента при сахарном диабете может оказать благоприятное влияние на гликемический контроль и работу ферментных систем.

**Цель исследования** – показать влияние сульфата цинка на некоторые биохимические показатели крови у крыс с аллоксановым диабетом.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Был проведен экспериментальный анализ с целью выявить зависимость между цинком и метаболическими сдвигами у животных с экспериментальным диабетом. В качестве объекта исследования были выбраны самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L. линии *Wistar*) в возрасте 12 недель и массой тела 150-200 г. (n=24). Перед началом эксперимента все животные были произвольно разделены на 3 группы (по 8 в каждой): «Контроль» - животные, которым вводили 0,9% NaCl; «Диабет» - животные, подвергшиеся аллоксановой интоксикации; «Диабет + Цинк» - животные, получавшие ежедневно сульфат цинка, на фоне развития патологии. Животным из группы «Диабет + Цинк» сульфат цинка начали давать с 5 дня, от момента введения моногидрата аллоксана, в дозе 36 мг/кг ежедневно, в течение 30 дней. Индукцию диабета, осуществили однократным, внутрибрюшинным введением 5% раствора аллоксана в дозе 150 мг/кг.

Развитие патологии контролировали уровнем гликемии. Измерение проводили с помощью глюкометра Саттелит плюс («ЭЛТА», Россия). Забор крови для измерения динамических показателей осуществляли 1 раз в неделю (по средам) из хвостовой вены, натошак, в утренние часы. Все измерения проводили на спектрофотометре «Evolution™ 260 Bio». В качестве антикоагулянта использовался гепарин натрия соль. Используемые наборы: «АБРИС+», Россия: «Холестерин общий»; «ПИРУВАТ UV»; «Кальций А-III»; «Витал», Россия: «АЛТ»; «ЛДГ»; «Цинк»; «ЭЛТА», Россия: «ГЛИКОГЕМОТЕСТ».

Исследование не противоречит международным нормативным документам, регламентирующим проведения доклинических исследований, таким как Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.), Директива ЕС Directive\_2010/63/EU по охране

животных, используемых в научных целях, а также федеральным документам РФ, в т.ч. ФЗ 61, глава 5, ГОСТ 33044-2014 GLP.

Опыты проводили в восьмикратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони). Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при  $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные по оценке всех исследуемых показателей представлены в таблице. Перед постановкой эксперимента уровень гликемии у всех подопытных животных находился в пределах нормы и составлял  $6,4 \pm 0,23$  ммоль/л, на 2-й день, после инъекции моногидрата аллоксана, у крыс из групп «Диабет» и «Диабет + Цинк» уровень глюкозы резко повысился до  $11,2 \pm 0,17$  ммоль/л и на протяжении всего эксперимента находился выше референсных значений. На 5-е сутки, от момента введения 5% раствора аллоксана, группе «Диабет + Цинк» начали добавлять в поилки таблетки «Цинкит» в дозе 36 мг/кг массы тела. В результате гликемия у группы «Диабет + Цинк» (среднее  $18 \pm 2,5$  ммоль/л) начала постепенно снижаться и колебалась в течение всего эксперимента, примерно в 1,5 раза ниже относительно группы «Диабет» (среднее значение  $26 \pm 3,5$  ммоль/л). У контрольных животных гликемия колебалась в допустимых пределах в течение всего эксперимента (среднее  $6 \pm 1,5$  ммоль/л).

У животных группы «Диабет» уровень гликированного гемоглобина составил 22,7%, что полностью коррелирует с высокими значениями гликемии. У группы «Контроль» значение данного показателя находилось в пределах нормы (2-6%) и составляло 6,5%. В группе «Диабет + Цинк» уровень гликогемоглобина составил 9,5%.

У обеих экспериментальных групп «Диабет», «Диабет + Цинк» уровень общего холестерина находился, как и у группы «Контроль» в референсных пределах для крыс.

Анализ активности общей фракции ЛДГ (референсные значения составляют 150-450 Е/л) в плазме крови показал, что в группе «Диабет» и «Диабет + Цинк» данный показатель был примерно в 1,2 раза выше ( $509 \pm 30$  и  $499 \pm 40$  Е/л соответственно), чем у контрольной группы ( $428 \pm 20$  Е/л).

Активность АЛАТ в группах «Диабет» и «Диабет + Цинк», в течение всего эксперимента колебалась в референсных пределах (до 60 Е/л).

Нормальными значениями пирувата в плазме крови для лабораторных крыс являются 50-100 мкмоль/л. Данный показатель находился в пределах нормы.

Концентрация общего кальция в плазме у крыс в норме - 0.9-2.1 ммоль/л. Уровень общего кальция у всех групп находился в референсных пределах, однако имеется тенденция к снижению его концентрации, как в группе «Диабет», так и «Диабет + Цинк».

Уровень общего цинка в группе «Диабет» резко повысился, примерно в 1,5 раза, однако в группе «Диабет + Цинк» данный параметр вернулся к значениям, характерным для контрольной группы (Таблица 1).

Таблица 1.

Оценка динамических показателей в плазме крови

Показатели	Контроль	Диабет	Диабет + Цинк
Глюкоза, ммоль/л	$6,01 \pm 1,5^*$	$25,89 \pm 3,5^*$	$18,18 \pm 2,5^*$
Гликированный гемоглобин, %	6,5*	22,7*	9,5*
Общий холестерин, ммоль/л	$1,69 \pm 0,23^*$	$2,55 \pm 0,05^*$	$2,23 \pm 0,3$
АЛАТ, Е/л	$22,31 \pm 1,25$	$20,17 \pm 2,1$	$25,03 \pm 2,75$
ЛДГ, Е/л	$428,36 \pm 20^*$	$509,67 \pm 30^*$	$499,61 \pm 40$

Пируват, мкмоль/л	57,46±3,5*	65,85±4,2*	54,45±3,76
Кальций, ммоль/л	2,58±0,2	2,4±0,4	1,945±0,25*
Цинк, мкмоль/л	27,7±4,36*	41,38±5,2*	28,4±2,4*

Примечание: \*различия показателей статистически значимы (p<0,045)

## ОБСУЖДЕНИЕ

Так как моногидрат аллоксана похож по своей структуре на молекулу глюкозы, то при его введении он проникает в клетки с помощью транспортера ГЛЮТ-2, который локализован преимущественно в поджелудочной железе, а также печени и тонкой кишке [1]. Основным механизмом диабетогенного эффекта, как правило является угнетение секреции инсулина, в результате инактивации глюкокиназы, что достигается за счет окисления тиоловых групп энзима. В результате повреждения β-клеток происходит нарушение секреции инсулина, что сопровождается повышенной гликемией. В следствии увеличения концентрации глюкозы, она может неферментативно взаимодействовать с молекулами белка (гликирования), что приводит к нарушению функций последних. В некоторых статьях встречается информация о том, что у диабетиков снижена концентрации именно лабильного цинка, в то время как концентрация общего цинка может быть выше нормальных значений [2]. Это в свою очередь приводит к недоступности ионов цинка для осуществления различных биохимических и молекулярных взаимодействий. Но прием сульфата цинка привел к частичному восполнению данной потери, что способствовало незначительному восстановлению гликемии и, как следствие, снижению гликирования. Уровень пирувата в плазме крови при этом не изменился.

При затруднении поступлении глюкозы в клетки, запускаются нейрогуморальные механизмы, результатом которых является мобилизация альтернативных источников энергии (гликогенолиз, окисление жирных кислот, глюконеогенез). Имеются различные данные об изменении липидного профиля при индукции экспериментального диабета. А это в свою очередь может оказывать негативное влияние на организм животного за счет окислительного стресса, ПОЛ и также атеросклероза. Помимо того, что цинк является участником антиоксидантной системы организма (входит в состав СОД), было показано, что дефицит цинка снижает утилизацию жирных кислот в митохондриях и пероксисомах и повышает синтез липидов в печени крыс, влияя на экспрессию генов, кодирующих ферменты, способствующие липидному гомеостазу печени [3].

Основными сывороточными (органоспецифическими) ферментами, которые участвуют в его метаболизме являются ЛДГ и АлАТ. Также активность данных ферментов в плазме крови может изменяться при различных патологических состояниях, в том числе и диабете. Считается, что повышение активности ЛДГ в основном связано с повреждением клеток, в результате оксидативного стресса. Однако в последнее время стали также появляться статьи, в которых говорится о снижении концентрации кислорода в крови при диабете [4], что косвенно также может оказывать влияние на активность ЛДГ. Имеются противоречивые данные об активности АлАТ в плазме крови у лабораторных крыс с экспериментальными моделями диабета. Однако мы не обнаружили существенных изменений в активности АлАТ в группах «Диабет» и «Диабет + Цинк». Вероятно, для подобных изменений необходима более длительная экспозиция.

Кальций является одним из важнейших внутриклеточных микроэлементов. Так как значительные его изменения в плазме могут привести к летальному исходу, то его уровень жестко регулируется двумя основными гормонами (паратиреоидным и кальцитонином). Имеются противоречивые данные об изменении содержания концентрации кальция в плазме крови при диабете. Некоторыми авторами было показано уменьшение концентрации кальция в крови крысах при развитии данной патологии [5]. Связывают это с нарушением работы ЖКТ, что в свою очередь приводит к нарушению всасывания и усвоения ряда веществ, в том числе и ионов (особенно Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>). Показано, что у крыс с аллоксановым диабетом, снижение чистого всасывания кальция было связано с уменьшением потока кальция из просвета в плазму в двенадцатиперстной и подвздошной кишках [6]. Так же доказано, в тонком кишечнике и культивируемых клетках кишечника СД, а также при повышении концентрации

глюкозы и продуктов гликирования, наблюдается снижение всасывания кальция, предположительно, за счет уменьшения экспрессии ядерных рецепторов витамина D и индуцирования окислительного стресса [7]. Интересно, что при приеме сульфата цинка общий уровень кальция в плазме крови тоже снижался.

Концентрация общего цинка, как было отмечено ранее, повышалась у больных животных. По литературным данным цинк в организме находится в основном в связанном с белками состоянии и лишь относительно небольшая часть представлена лабильной формой. В условиях экспериментальной гипергликемии мы наблюдали достоверное увеличение концентрации общего цинка в группе «Диабет», при этом у животных, которые принимали препарат, содержащий сульфат цинка («Диабет + Цинк»), наблюдалось возвращение значений данного параметра к значениям контрольной группы. Считается, что такое состояние при диабете может быть связано с повышением цинк-связывающей активности белков. Попытка организма скомпенсировать потерю приводит к снижению концентрации лабильного цинка и его недоступности для клеток. В группе «Диабет + Цинк», за счет частичной, искусственной компенсации, баланс цинка восстанавливался, что положительно отражалось на некоторых параметрах.

В связи с ограниченностью некоторых наборов и аппаратуры не получилось провести более детальное исследование ионного состава (отношение лабильной и общей фракции ионов). Однако, проведенные исследования позволили установить, что пероральное введение сульфата цинка крысам с аллоксановым диабетом способствовало восстановлению ряда биохимических параметров крови, что позволяет предположить возможный положительный эффект при применении данного препарата в дополнение к основным сахароснижающим лекарственным средствам.

## **ВЫВОДЫ**

1. Прием цинка способствует частичному восстановлению гликемии, снижению уровня гликированного гемоглобина, снижению общего цинка, а также частично оказывает влияние на концентрацию общего холестерина

2. Пероральное введение сульфата цинка не оказывает влияния на ЛДГ и АлАТ, на концентрацию общего кальция, а также молекул пировиноградной кислоты

## **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Thorens, B. GLUT2, Glucose Sensing and Glucose Homeostasis / B. Thorens // *Diabetologia*. – 2015. – Vol 58, №2. – P. 221-232.
2. Повышение общей концентрации катионов цинка и снижение концентрации лабильного цинка в крови больных сахарным диабетом типа I / М.И. Гарипова, О.С.Ильина, О.Л.Буторина [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 4-2. – С. 368-370.
3. Transcriptome and proteome analysis identifies the pathways that increase hepatic lipid accumulation in Zinc-deficient rats / H. Dieck, F. Döring, D. Fuchs [et al.] // *The Journal of nutrition* – 2005. – Vol. 135, №2. – P. 199–205.
4. Lower Blood Oxygen Saturation is Associated With Microvascular Complications in Individuals With Type 1 Diabetes / J. C. Laursen, H. I. Mizrak, H. Kufaiishi [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* – 2022. – Vol. 108, № 1. – P. 99-106.
5. The duodenal  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rats with experimentally induced diabetes / Y. Seino, R. I. Sierra, Y. M. Sonn [et al.] // *Endocrinology* – 1983. – Vol. 113, № 5. – P. 1721–1725.
6. Schneider, L. E. Diabetes and intestinal calcium absorption in the rat / L. E. Schneider, H. P. Schedl // *The American journal of physiology*. – 1972. – Vol. 223, № 6. – P. 1319–1323.
7. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. I. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption / B. L. Nyomba, J. Verhaeghe, M. Thomasset [et al.] // *Endocrinology* – 1989. – Vol. 124, № 2. – P. 565–572.

## **Сведения об авторах**

М.М. Винокуров\* – студент медико-биологического факультета

Я.И. Дедов – аспирант медико-биологического факультета

Н.В. Селиванова – кандидат биологических наук, доцент

А.Т. Епринцев – доктор биологических наук, профессор

## **Information about the authors**

M.M. Vinokurov\* – Student of Faculty of Medicine and Biology

Ya.I. Dedov – Postgraduate student of Faculty of Medicine and Biology

N.V. Selivanova – Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor

A.T. Eprintsev – Doctor of Sciences (Biology), Professor

\***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

vinokurovm41@gmail.com