

ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ ДОЗА ПРЕПАРАТА ЦИНКА НА ВРЕДНОСТИ ГЛИКЕМИЈЕ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА КОД ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИЗАЗВАНОГ ДИЈАБЕТЕСА КУНИЋА

Станојевић З.¹, Митић Р.¹, Станић М.², Милетић М.³, Ваљаревић Д.⁴, Хаџистевић С.¹, Дејановић М.³

¹Институт за фармакологију и токсикологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Биохемијско-клиничка лабораторија, Здравствени центар Косовска Митровица

³Институт за физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

⁴Одсек за математику, Природно-математички факултет Приштина, Косовска Митровица

EFFECTS OF DIFFERENT DOSES OF ZINC PREPARATION ON GLYCEMIA AND ANTIOXIDANT PARAMETERS IN EXPERIMENTALLY INDUCED DIABETIC RABBITS

Станојевић З.¹, Митић Р.¹, Станић М.², Милетић М.³, Ваљаревић Д.⁴, Хаџистевић С.¹, Дејановић М.³

¹Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

²Biochemical-Clinical Laboratory, Health Center Kosovska Mitrovica

³Institute of Physiology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

⁴Department of mathematics, Faculty of Natural Sciences and mathematics Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Researches with micronutrients are getting more and more important in science and also in practice. In this view zinc, chromium, copper and selenium are having a special role in preventing micro- and macrovascular diabetic complications, as integral components of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and also as cofactor of enzymes and hormones involved in the metabolism of glucose and lipid. The aim of this study was to evaluate the effects different doses of zinc on glycemia and parameters of antioxidative defense: superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant status (TAS), and correlation glycoregulation with antioxidant system of the alloxan-induced diabetic rabbits. The study was conducted on fourteen New Zealand rabbits of both sexes, weighing 2 to 3.5 kg. Experimental diabetes was induced in rabbits by intravenous injection of alloxan (80 mg /kg BW). Three weeks after induced experimental diabetes, rabbits were treated orally appropriate doses of chelated zinc: I dose - 15 mg, after a washout period (10 $t_{1/2}$), II dose - 25 mg, after a washout period, III dose - 50 mg. Blood samples were taken at specific time intervals: before alloxan induced diabetes, after alloxan induced diabetes, after application the first dose of 15 mg of zinc, after application of a second dose of 25 mg of zinc, after application of third dose of 50 mg of zinc. The zinc preparation did not cause a statistically significant reduction in serum glucose level when administered in single doses 15, 25 and 50 mg in experimentally induced diabetic rabbits. However, the activity of superoxide dismutase (SOD) was significantly increased after single dose preparations of zinc at a dose 15 mg ($p < 0,05$), 25 mg ($p < 0,001$) and 50 mg ($p < 0,001$) in relation to the activity recorded before the application of zinc. Also, after the application first, second, and than third dose of zinc in diabetic rabbits was recorded statistically significant increase of TAS in relation to the value recorded before the application of zinc ($p < 0,001$). Glucose concentrations negatively correlated with superoxide dismutase activity. This indicates that oral application of zinc preparation can reduce the harmful effects of oxidative stress in diabetes.

Key words: diabetes; zinc; rabbit; glycemia; superoxide dismutase; total antioxidant status

САЖЕТАК

Истраживања везана за микронутријенсе добијају све већи значај како у науци, тако и у пракси. У том погледу посебно се истиче улога цинка, хрома, бабра и селена у спречавању микро- и макроангиопатских компликација дијабетеса, било као интегралних компоненти антиоксидационих ензима (супероксид дисмутазе и глутатион пероксидазе), било као кофактора ензима и хормона укључених у метаболизам глукозе и липида. Циљ рада је био да се испитају ефекти различитих доза препарата цинка на гликемију и параметре антиоксидативне заштите: супероксид дисмутаза (СОД) и тотални антиоксидантни статус (ТАС), као и међусобну повезаност гликорегулације са антиоксидативним системом код експериментално изазваног дијабетеса кунића. Испитивање је спроведено на 14 новозеландских кунића, оба пола, телесне масе 2-3.5 кг. Експериментални дијабетес код кунића изазван је и.в. ињекцијом алоксана (80 мг/кг ТМ). Три недеље након изазивања експерименталног дијабетеса, животиње су третиране перорално одговарајућим дозама хелираног цинка: I доза - 15 мг; након *washout* периода (10 $t_{1/2}$), II дозом - 25 мг и након поновног *washout* периода (10 $t_{1/2}$), III дозом цинка - 50 мг. Узорци крви узимани су у одређеном временском интервалу: пре експериментално изазваног дијабетеса, након експериментално изазваног дијабетеса, након апли-

кације прве дозе цинка 15 мг, након апликације друге дозе цинка 25 мг, након апликације треће дозе цинка 50 мг. Препарат цинка није изазвао статистички значајно смањење вредности гликемије када је апликован једнократно у дози од 15, 25 и 50 мг код експериментално изазваног дијабетеса кунића. Међутим, активност супероксид дисмутазе (СОД) је статистички значајно повећана након једнократне апликације препарата цинка у дози од 15 мг ($p < 0,05$), 25 мг ($p < 0,001$) и 50 мг ($p < 0,001$) у односу на активност забележену пре апликације цинка. Такође, након апликације прве, друге, а затим и треће дозе цинка код дијабетичних кунића забележено је статистички значајно повећање вредности тоталног антиоксидантног статуса (ТАС) у односу на вредност забележену пре апликације цинка ($p < 0,001$). Концентрација глукозе негативно корелира са активношћу супероксид дисмутазе (СОД). Ово указује да перорална апликација препарата цинка може да смањи штетне ефекте оксидативног стреса у дијабетесу.

Кључне речи: дијабетес; цинк; кунић; гликемија; супероксид дисмутаза; укупни антиоксидантни статус

УВОД

Последњих година, истраживања везана за микроелементе добијају све већи значај и актуелност како у науци, тако и у пракси. У том погледу посебно се истиче улога микронутријенса (цинка, хрома, бабра и селена) у спречавању микро и макроангиопатских компликација дијабетеса, које се налазе у основи дијабетесне нефропатије, ретинопатије, неуропатије и кардиоваскуларне болести, било као интегралних компоненти антиоксидативних ензима (супероксид-дисмутаза и глутатион-пероксидаза), било као кофактора ензима и хормона укључених у метаболизам глукозе и липида (1).

Узевши у обзир значај у деоби и диференцијацији ћелија, програмираној ћелијској смрти, транскрипцији ДНК, деловању хормона, биолошких мембрана и имунолошког састава, разградњи ванћелијских пептида, синтези и разградњи колагена и др., цинк вероватно има водећу улогу у омогућавању исправног деловања различитих ткива и органа, као и организма у целини. Данас је познато више од 300 металоензима и преко 500 протеина регулатора гена за чије деловање је неопходно присуство цинка. Учествујући у специфичним ензимским реакцијама, цинк олакшава искоришћавање аминокиселина и фосфора и уградњу тимидина у ДНК и уридина у РНК, односно неопходан је за активност ДНК и РНК полимеразе. Позната је и есенцијална улога цинка у транскрипцији полинуклеотида, а самим тим и у процесу генетске експресије. Цинк је неопходан за деловање металотионеина јетре који имају улогу у уклањању тешких метала из организма (као што је бакар) и спречавању ослобађања реактивних кисеоничних врста (2). Својим антиоксидантним својствима и стабилизацијом мембрана цинк штити од дестабилишућих агенса, првенствено полинезасићених масних киселина и инфламаторних цитокина, што указује на антиатерогени потенцијал цинка у превенцији метаболичких поремећаја (3). Релативно новија истраживања указују и на синергистичко дејство цинка са есенцијалним масним киселинама и простагландинима у регулацији секреције инсулина и метаболизма глукозе (4).

Болесници са дијабетес мелитусом, независно од типа, излучују велике количине цинка урином, понекад и преко 1000 $\mu\text{g}/24$ сата, у поређењу са здравим доброволцима (300-600 $\mu\text{g}/24$ сата) (5). Иако је доста рађено на осветљавању узрока настанка хиперцинкурије у дијабетесу, ова појава још увек није разјашњена. У прилог хипотези да хиперцинкурија настаје као резултат хипергликемије, иду резултати неколико клиничких студија о позитивној корелацији између цинкурије и HbA1c (гликолизованог хемоглобина) у крви дијабетичара (6). Новија истраживања о улози инсулина као физиолошког инхибитора цинкурије, искључују могућу повезаност хиперцинкурије са ефектима инсулина на реналне тубуле (7). Потврда томе су и налази Nonogat-a и cap (1992), да примена препарат инсулина може да редукује хиперцинкурију, док орални антидијабетици не испољавају ефекте, у смислу смањења повећаног излучивања цинка урином, присутним у инсулин независном дијабетес мелитусу. У том погледу би била оправдана истраживања која указују да би умерен унос суплемента цинка (15-50 мг/дан) могао да коригује овај поремећај.

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ рада био је да испитамо ефекте различитих доза препарата цинка на гликемију и вредност антиоксидативних параметара, као и међусобну повезаност гликорегулације са антиоксидативним системом код експериментално изазваног дијабетеса кунића.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Испитивање је спроведено на 24 новозеландских кунића, оба пола, телесне масе 2-3,5 кг. Животиње су биле смештене у просторији која је проветравана више пута у току дана и осветљавана 14 сати дневно. Током целог дана животиње су имале слободан приступ води и храни (пелете које производи Ветеринарски завод Земун).

Експериментални дијабетес код кунића изазван је и.в. ињекцијом алоксана (80 мг/кг ТМ), у ушну вену, након ноћног 12-то часовног периода гладовања (Vogel HG. Drug discovery and Evaluation. Pharmacological Assays Second Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002). Две недеље (14 дана) након апликације алоксана, животиње су биле подвргнуте 16-то часовном гладовању, након чега је одређивана концентрација глукозе у крви. С обзиром на различита општења панкреаса са наведеном дозом алоксана, у оглед су укључена само 14 кунића са гликемијом наше између 9,99 - 14,98 mmol/L, што би одговарало степену општења панкреаса код болесника са инсулин независним дијабетес мелитусом.

Три недеље након апликације алоксана, животиње су третиране одговарајућим дозама препарата цинка перорално: најпре првом дозом од 15 мг, након washout периода (10 t_{1/2}) другом дозом од 25 мг и након понов-

ног washout периода (10 t_{1/2}) трећом дозом цинка од 50 мг. За испитивање је употребљен дијететски суплемент цинка (Helirani sink tabl. 25 mg, Natural Wealth). Таблете цинка су претходно растваране у води. Нови раствори прављени су свакодневно.

Животиње су биле третиране у складу са принципима Интернационалног водича за етичност при раду са експерименталним животињама (International Ethical Guidelines for Biomedical Research Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), 1984).

Узорци крви узимани су у одређеном временском интервалу:

- пре експериментално изазваног дијабетеса (контрола - К)
- након експериментално изазваног дијабетеса (дијабетес - Д)
- 8 сати након апликације прве дозе цинка 15 мг (Д+цинк 15 мг)
- 8 сати након апликације друге дозе цинка 25 мг (Д+цинк 25 мг)
- 8 сати након апликације треће дозе цинка 50 мг (Д+цинк 50 мг).

Глукоза и тотални антиоксидантни статус (ТАС) одређиване су у серуму након центрифугирања узорка крви. Глукоза је одређена GOD/PAP (glukoza oksidaza/pe-roksidaza) ензимском реакцијом на 500 nm са ELITECH комплетом (8). ТАС је одређен RANDOX комерцијалним комплетом на 600 nm уз примену фосфатног пуфера рН 7,4 и хромогена (метмиоглобин и АБТС) (9).

У лизату еритроцита одређивана је активност ензима супероксид дисмутазе (СОД). Лизат еритроцита је добијен центрифугирањем 0,5 мл пуне крви 10 минута на 3000 rpm. Након одвајања плазме, еритроцити су испрани 4 пута са 3 мл 0,9% раствора NaCl, центрифугирањем 10 минута на 3000 rpm после сваког испирања. Овако испрани еритроцити су лизирани до 2 мл хладном редестилованом водом, промешани и остављени да одстоје 15 минута на +4°C. У припремљеном лизату одређивана је цијанметхемоглобинском методом концентрација хемоглобина. Лизат је затим разблажен Randox sample diluentom 25 пута. У овако припремљеном лизату еритроцита СОД је одређивана RANDOX комерцијалним комплетом на 505 nm. У овој методи су укључени ксантин и ксантин оксидаза да би настали супероксид радикали који реагују са И.Н.Т. градећи обојени формаган. Активност СОД се мери степеном инхибиције ове реакције и изражена је у jed./g Hb (10).

Тестирање статистичке значајности разлике између средњих вредности извршено је Студент т-тестом за мале и зависне узорке. Међусобна повезаност између две мерене варијабле одређивана је израчунавањем коефицијента линеарне корелације (r). Критеријум за статистичку значајност био је p<0,05; p<0,01 и p<0,001.

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Вредност гликемије била је статистички значајно повећана код кунића након изазивања експерименталног дијабетеса у односу на стање забележено пре апликације алоксана и изазивања експерименталног дијабетеса (p<0,001). Међутим, након апликација прве (15 мг), затим друге (25 мг) и на крају треће дозе цинка (50 мг) није дошло до статистички значајног снижења вредности гликемије у односу на стање након изазивања експерименталног дијабетеса пре апликације лека (Таб. 1).

Активност ензима супероксид дисмутазе (СОД) била је статистички значајно смањена код кунића након експериментално изазваног дијабетеса у односу на активност забележену пре апликације алоксана и изазивања експерименталног дијабетеса (p<0,001). Након апликације прве дозе цинка од 15 мг код дијабетичних кунића забележено је статистички значајно повећање активности СОД-а у односу на активност забележену пре апликације цинка (p<0,05). Такође, статистички значајно повећање активности СОД-а забележено је и након апликације друге дозе од 25 мг, а затим и треће дозе од 50 мг цинка у односу на активност забележену пре апликације цинка (p<0,001) (Табела 1).

Апликација треће дозе цинка од 50 мг код дијабетичних кунића довела је до статистички значајног повећања активности СОД и у односу на активност забележену након апликовања прве дозе од 15 мг, а такође и друге дозе цинка од 25 мг (p<0,01).

Вредност тоталног антиоксидантног статуса (ТАС) била је статистички значајно смањена код кунића након експериментално изазваног дијабетеса у односу на стање пре апликације алоксана и изазивања експерименталног дијабетеса (p<0,001). Након апликације прве дозе цинка од 15 мг, затим друге од 25 мг и на крају треће дозе од 50 мг код дијабетичних кунића забележено је статистички значајно повећање вредности ТАС у односу на вредност забележену пре апликације цинка (p<0,001) (Табела 1).

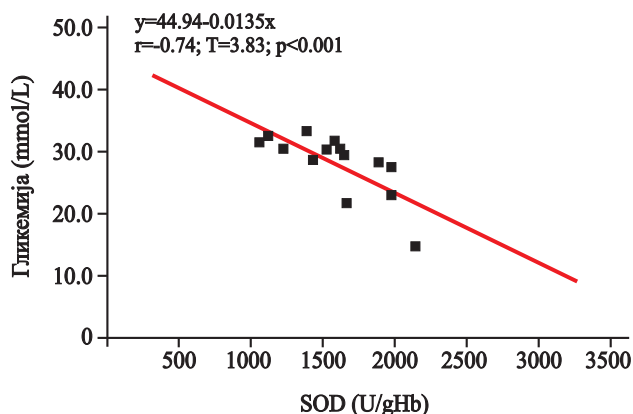
Између вредности гликемије и активности СОД-а код дијабетичних кунића третираних дозом цинка од 25 мг забележена је значајна, негативна и висока

Табела 1. Ефекти различитих доза препарата цинка на гликемију и вредност антиоксидативних параметара код експериментално изазваног дијабетеса кунића (n=14).

Испитиване варијабле	К (x-bar±SD)	Д (x-bar±SD)	Д+цинк 15 мг (x-bar±SD)	Д+цинк 25 мг (x-bar±SD)	Д+цинк 50 мг (x-bar±SD)
- Глукоза (mmol/L)	6.17±1.05	24.24±4.41 ^a	23.57±5.44	23.47±5.81	23.09±6.54
- СОД (U/gHb)	1934.71±438.01	1190.57±182.22 ^a	1433.14±286.88 ^b	1592.86±319.40 ^b	2092.79±591.61 ^{b,c,d}
- ТАС (mmol/L)	1.10±0.13	0.85±0.05 ^a	0.95±0.08 ^b	0.96±0.08 ^b	0.99±0.06 ^b

^a К: D p<0.001; ^b D: Д+цинк 15 мг - p<0.001; ^c D: Д+цинк 25 мг - p<0.001; ^d D: Д+цинк 50 мг - p<0.001

корелација ($r=-0,74$) (Графикон 1). Између осталих испитиваних варијабли није забележена статистички значајна корелација.



Графикон 1. Корелација између вредности гликемије и активности СОД-а (супероксид дисмутазе) код дијабетичних кунџа након апликације цинка у дози од 25 мг

ДИСКУСИЈА

На основу добијених резултата може се уочити да једнократна примена препарата цинка не остварује значајне ефекте у смислу смањења концентрације глукозе у крви дијабетичних кунџа. Налази су у сагласности са досадашњим литературним подацима, иако су неке студије показале да суплементи цинка имају потенцијално корисне ефекте на хомеостазу глукозе у хроничном дијабетесу (11).

Како би испитали антихипергликемијске ефекте цинка, Simon и сар. (2001) упоређују ефекте исхране дефицитарне у цинку и примену суплемента цинка код дијабетичних мишева током шест недеља. Група дијабетичних мишева која је добијала цинк показала је сигнификантно ниже вредности гликемије напште у односу на групу дијабетичних мишева храњених оброком дефицитарним у цинку (12). Сличне резултате, у смислу побољшања хипергликемије код дијабетичних мишева који су цинка добијали у пијућој води, континуирано током две недеље, добио је и Chen са сарадницима, годину дана раније (13).

Цинк спада у есенцијалне елементе који је неопходан за интегритет ћелијске мембране, метаболизам глукозе, али је првенствено директно укључен у метаболизам инсулина. Везивањем за хормоне пептидне природе цинк ствара активну просторну конфигурацију, а модификовањем облика рецептора на површини ћелијских мембрана или у једру ћелије обезбеђује и биолошку активност хормона. Наиме познато је да цинк, као кофактор ензима у метаболизму хормона, има важну улогу у синтези, складиштењу и секрецији инсулина, као и одржавању конформацијског интегритета инсулина у хексамерној форми. Дефицит цинка несумњиво неповољно утиче на способност β -ћелија панкреаса да синтетишу и излуче инсулин, што је и документовано бројним студијама (14,15).

За разлику од већине метала, који фаворизују настајак оксидативног стреса, сматра се да цинк делује

као стабилизатор мембрана, да има значајну улогу у антиоксидативној заштити и инхибицији оксидативног стреса. Механизми антиоксидативног дејства цинка се могу поделити на акутне и хроничне. На акутни ефекат цинка као антиоксиданса указано је касних 80-тих година XX века. Предложена су два механизма његовог дејства: 1) заштита сулфхидрилних група протеина и ензима од напада слободних радикала или оксидације и 2) смањење образовања хидроксилног радикала превенцијом образовања слободних радикала или, другим речима, антагонизам редокс активних прелазних метала као што су гвожђе и бакар. Хронично давање цинка је пример индиректног дејства овог метала на оксидативни стрес. Ова позитивна улога је можда у вези са индукцијом других антиоксиданаса, посебно металотионеина (16).

Као кофактор у синтези антиоксидативних ензима, попут ензима супероксид-дисмутазе (СОД), дефицит цинка би могао додатно да допринесе даљем развоју патолошких промена и компликација које прате дијабетес. Код сисара постоје две врсте овог ензима (две изоензимске форме): ензим бакар/цинк садржавајућа супероксид-дисмутаза (CuZnSOD) у цитозолу и ензим који садржи манган у активном центру (MnSOD) у митохондријама. Каталитичка активност ензима CuZnSOD везана је за бакар, док цинк стабилизује конформацију ензима. Бројне студије су показале нижу активност ензима CuZnSOD у особа са дијабетесом, али и у случајевима изолованог дефицита цинка (17).

Негативна корелација између концентрације глукозе и активности супероксид дисмутазе се вероватно доводи у везу са негативним утицајем хипергликемије и гликозилације протеина на каталитичку активност ензима.

ЗАКЉУЧАК

Наши резултати показују да једнократна перорална апликација препарата цинка доводи до статистички значајног повећања активности ензима супероксид дисмутазе (СОД), као и тоталног антиоксидативног статуса (ТАС) код експериментално изазваног дијабетеса кунџа. Значајно повећање тоталног антиоксидативног статуса и активности супероксид дисмутазе забележено је након примене све три дозе цинка (15 мг, 25 мг, 50 мг), али је најизразитије повећање забележено након апликације дозе од 50 мг. Ово указује да перорална апликација препарата цинка може да смањи штетне ефекте оксидативног стреса у дијабетесу.

Насупрот томе, једнократна перорална апликација препарата цинка није изазвала ефекте у смислу смањења вредности гликемије, чак и када је препарат цинка апликован у највећој дози од 50 мг.

Концентрација глукозе негативно корелира са активношћу супероксид дисмутазе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thompson K.H., Godin D.V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes mellitus. *Nutrition Research*, 1995; 15(9):1377-1410.
2. Domitrović R., Milil Ć. Биокимија цинка. *Biochemica Medica* 2000; 10(1-2):21-7.

3. Tasić NM, Radak Đ, Cvetković Z, Marijan M, Tasić D, Radak S, Nešković AN, Đorđević-Denić G. Cink i ateroskleroza karotidnog plaka. *Scr Med* 2005;1(1):48.
4. Rosenthal M.J., Hwang I.K. Effects of arachidonic acid and cyclo (his-pro) on zinc transport across small intestine and muscle tissues. *Life Sciences* 2001; 70:337-48.
5. Brandão-Neto J., Silva C., Rezende A., Almeida M., Sales V., Marchini J. Zinc pharmacokinetics in insulin-dependent diabetes mellitus patients after oral zinc tolerance test. *Nutrition Research* 2003; 23:141-50.
6. Kaji M. Zinc in Endocrinology. *International Pediatrics* 2001; 16(3):1-7.
7. Brandão-Neto J., Silva C., Shuhama T., Silva J., Oba L. Renal handling of zinc in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *BioMetals* 2001; 14:75-80.
8. Burin JM, Price CP. Measurement of blood glucose. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 327-42.
9. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Miller A. *Clinical Science* 1993; 84: 407-412.
10. Goldstein S, Michel C, Boors A, Saran M, Czapsky G. A critical re-evaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radical Biol Med* 1988; 4: 295-303.
11. Chen M.D., Lion S.J., Lin P.Y., Yang V.C., Alexander P.C., Lin W.H. Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese mice. *Biol.Trace Elem.Res.* 1998; 61(3):303-11.
12. Simon SF, Taylor CG. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(1):43-51.
13. Chen MD, Song YM, Lin PY. Zinc effects on hyperglycemia and hypoleptinemia in streptozotocin induced diabetic mice. *Horm Metab Res.* 2000;32(3):107-9.
14. Tallman D.L., Taylor C.G. Potential interactions of zinc in the neuroendocrine-endocrine disturbances of diabetes mellitus type 2. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1999; 77(12):912-33.
15. Yoshikawa Y., Ueda E., Kojima Y., Sakurai H. The action mechanism of zinc(II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes. *Life Sciences* 2004; 75:741-51.
16. Đukić M. Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. *Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu*, 2008.
17. Duzguner V., Kaya S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense system of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 42: 1481-86.