

УДК 577.118:614.449:678.048

Р. Я. Іскра, к.с.-г.н, докторантІнститут біології тварин НААН, лабораторія біохімії адаптації та онтогенезу тварин,
вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна, e-mail: iskra_r@ukr.net**ВПЛИВ ЦИТРАТУ ХРОМУ НА СТАН СИСТЕМИ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В КРОВІ ТА ТКАНИНАХ
ВАГІТНИХ ЩУРІВ**

Досліджували вплив цитрату хрому в дозі 10 мкг Cr^{3+} /кг маси тіла на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів у крові та тканинах вагітних самок лабораторних щурів. Встановлено, що за дії цитрату хрому підвищувалася активність супероксиддисмутази в крові (в 1,3 раза), м'язях (в 3,0 раза), мозку (в 3,2 раза), селезінці (в 3,5 раза), серці (в 6,3 раза) та каталази — в м'язях (в 1,2 раза), нирках (в 1,4 раза), селезінці (в 1,5 раза) самок у період вагітності.

Ключові слова: щур, цитрат хрому, вагітність, антиоксидантна система.

Дослідження на людях і тваринах показали, що активні форми кисню (АФК) беруть участь у модуляції спектру фізіологічних репродуктивних процесів — від дозрівання яйцеклітини до її запліднення, розвитку ембріона і вагітності [9]. У той же час, АФК можуть бути пов'язані з гінекологічними захворюваннями, впливати на загальні механізми їх етіопатогенезу [8].

У стані вагітності в організмі тварин проходить низка адаптаційно-приспосувальних процесів, які направлені на забезпечення адекватного її протікання, а також росту і розвитку плоду. Під час вагітності у зв'язку з підвищенням основного обміну і збільшенням споживання кисню в крові відбуваються значні біохімічні зміни: підвищується концентрація загальних ліпідів, у т.ч. нейтрального жиру та холестеролу [2]. Також збільшується активність фосфоліпази A_2 . У результаті її дії в крові підвищується концентрація ненасичених жирних кислот, які є безпосереднім субстратом для перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Крім цього, АФК можуть також надходити в організм матері від ембріона, утворюватися в результаті обміну речовин в його організмі. Встановлено, що у жінок в останній період вагітності та напередодні пологів проходить інтенсифікація процесів ПОЛ, у відповідь на яку активується антиоксидантна система (АОС) [4]. При вагітності стан ПОЛ та АОС встановлюються на новому, більш високому рівні, який відображає компенсований процес адаптації організму жінки [3].

У дослідженнях деяких авторів було встановлено, що статевий гормон — 17 β -естрадіол інгібує секрецію інтерлейкіну-6 і адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин в культуральному середовищі моноцитів, інкубованих з H_2O_2 , або глюкозою у високій концентрації. Однак, комплексне застосування 17 β -естрадіолу і хрому (Cr) надає можливість при значно нижчих дозах гормону гальмувати синтез інтерлейкіну-6 та інгібувати ПОЛ [15]. Це особливо важливо, якщо врахувати, що є певний ризик застосування високих доз естрадіолу, а використання більш низьких доз гормону в комбінації з хромом є необхідним для досліджень жінок-діабетиків в період постменопаузи [15].

Встановлено, що Сг проявляє подвійні властивості як антиоксиданта, так і про-оксиданта, що може пояснюватися його участю в окисно-відновних процесах. Реакції сполук Сг з перекисами ліпідів, ймовірно, відповідальні за здатність цих сполук знижувати рівень ПОЛ [11]. Застосування мікроелемента у вигляді карбоксилату лимонної кислоти, яка синтезується в організмі людини і тварин та бере участь в циклі Кребса, значно підвищує біодоступність хрому та є перспективним напрямом досліджень.

Мета досліджень – дослідити вплив цитрату хрому на активність ензимів АОС в крові та тканинах самок щурів під час вагітності.

Матеріали та методи

Дослідження проведені на самках білих лабораторних щурів лінії Вістар, масою 180–200 г, які перебували у віварії за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону. Утримання тварин та всі експерименти виконані з дотриманням положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики. Тварини були поділені на дві групи – контрольну і дослідну, по 6 тварин у кожній. Від початку спаровування самкам щурів дослідної групи, на відміну від контрольної, до питної води протягом 20 діб додавали розчин цитрату хрому в дозі 100 мкг Сг/л води (10 мкг Сг/кг маси тіла). Через 20 діб після спаровування тварин виводили з експерименту після проведеної евтаназії шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Матеріалом для дослідження служили проби крові та тканин самок щурів, відібраних при забої. У плазмі крові та гомогенатах тканин досліджували вміст гідропероксидів ліпідів за методом В. В. Мирончика, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію [1]. Вміст гідропероксидів ліпідів визначали за різницею екстинкцій між дослідним зразком і контрольним, в який замість гомогенату тканини додавали відповідну кількість бідистильованої води, а виражали в умовних одиницях на 1 г протеїну (або $\Delta D^{480}/г$).

Концентрацію ТБК-активних продуктів визначали за методом Є. Н. Коробейникова, який полягає у проведенні кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою [6]. Концентрацію ТБК-активних продуктів у зразку виражали в нмоль МДА на грам протеїну тканини. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.1.15.1.) визначали за методом Є. Є. Дубініної, принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами [5]. Розрахунок активності СОД визначали за відсотком інгібування відновлення нітросинього тетразолію у дослідній пробі за 1 хв., а виражали в умовних одиницях, із розрахунку на 1 мг протеїну. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за методом М. А. Корольок, принцип якого полягає у здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий кольоровий комплекс [7]. Активність ензиму виражали в нмоль $H_2O_2/хв$ x мг протеїну тканини.

Одержані цифрові дані опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft EXCEL. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Цитрат хрому, який випоювали самкам щурів суттєво не впливає на перебіг процесів перекисного окиснення ліпідів у їх крові, оскільки не виявлено вірогідних відмінностей вмісту гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів в крові тварин дослідної групи порівняно з контрольною (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту в крові самок щурів (M±m, n=6)

Показники крові	Контрольна група	Дослідна група
ГПЛ, ум. од/г протеїну	0,42±0,04	0,37±0,05
ТБК-активні продукти, нмоль МДА / г протеїну	5,28±0,41	3,97±0,75
СОД, ум. од./ 1 мг протеїну	14,5±1,67	19,1±0,96*
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /хв на 1 мг протеїну	2,85±0,14	2,96±0,44

Примітка: вірогідність різниць показників порівняно до контролю: * - p < 0,05

У тканинах самок дослідної групи, як і в крові, вміст гідропероксидів ліпідів вірогідно не змінюється (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах самок щурів (M±m, n=6)

Тканина	Група	Гідропероксиди ліпідів, ум. од/г протеїну	ТБК-активні продукти, нмоль МДА/г протеїну	СОД, ум. од./ 1 мг протеїну	Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /хв на 1 мг протеїну
Печінка	К	0,36±0,05	7,18±0,61	23,7±3,99	4,06±0,32
	Д	0,29±0,03	6,32±0,13	22,3±3,14	4,51±0,33
Нирки	К	0,40±0,09	7,00±0,39	21,1±3,27	4,36±0,13
	Д	0,33±0,08	6,39±0,64	30,0±4,65	6,03±0,35**
Мозок	К	0,23±0,05	6,91±0,74	7,0±0,20	10,61±1,36
	Д	0,18±0,04	6,02±0,43	22,5±2,49***	11,37±3,26
Селезінка	К	0,76±0,15	7,61±0,99	6,6±0,10	3,92±0,37
	Д	0,62±0,06	5,44±0,09	23,4±3,17***	6,04±0,85*
Легені	К	0,57±0,05	3,07±0,17	14,7±1,73	8,00±1,33
	Д	0,63±0,01	3,29±0,1	17,7±0,62	6,78±0,84
Серце	К	0,54±0,08	3,63±0,50	5,0±0,22	4,60±0,44
	Д	0,80±0,18	5,95±0,47**	31,3±1,62***	5,81±1,40
М'язи	К	0,22±0,04	2,89±0,06	7,7±0,97	6,71±0,07
	Д	0,14±0,03	3,52±0,14**	23,3±0,98***	8,15±0,55*

Примітка: вірогідність різниць показників порівняно до контролю: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001. К- контроль, Д – дослідна група.

Вміст ТБК-активних продуктів вірогідно зростає в серці (в 1,6 разів, $p < 0,01$) та м'язах (в 1,2 разів, $p < 0,01$) щурів дослідної групи порівняно до їх вмісту в тварин контрольної групи, проте в інших тканинах – вірогідних змін не спостерігається (табл. 2).

Отримані результати свідчать про те, що в самок щурів у стані вагітності хром не виявляє суттєвого впливу на процеси ПОЛ як у крові, так і в тканинах, крім серцевого та скелетного м'язів, де вони посилюються. Проте, в літературі є дані, які свідчать про зниження процесів ПОЛ у гепатоцитах щурів за дії хрому [13].

Цитрат хрому в період вагітності проявляє власні антиоксидантні властивості та стимулює до активації систему антиоксидантного захисту організму, яка запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, накопиченню супероксид-аніонів та пероксидів. У результаті проведених досліджень встановлено, що за дії цитрату хрому в крові та тканинах самок щурів підвищується активність основного ензиму антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази. Активність ензиму, який знешкоджує супероксидний радикал, напряму пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і залежить від кількості накопичених у тканині інтермедіатів. Так, активність СОД вірогідно зростає у тварин дослідної групи в крові (в 1,3 разів, $p < 0,05$), мозку (в 3,2 разів, $p < 0,001$), селезінці (в 3,5 разів, $p < 0,001$), серці (в 6,3 разів, $p < 0,001$) та м'язах (в 3,0 разів, $p < 0,001$). Одержані нами результати узгоджуються з даними літератури щодо регуляції активності СОД багатокomпонентною редокс-системою клітини, а також ролі інтермедіатів окисно-відновного метаболізму як тригерного механізму, який індукує синтез ензиму при збільшенні концентрації донорів електронів [10]. Є повідомлення, що добавки хрому можуть збільшувати вміст міді та цинку в крові, за рахунок покращення їх засвоєння, які, в свою чергу, стимулюють у печінці синтез Cu/Zn-залежної супероксиддисмутази [14].

Активність каталази, ензиму, який розщеплює H_2O_2 , що утворюється в результаті дисмутації супероксидного радикалу, за дії цитрату хрому зростає у нирках (в 1,4 разів, $p < 0,01$), селезінці (в 1,5 разів, $p < 0,05$) та м'язах (в 1,2 разів, $p < 0,05$). У крові активність ензиму вірогідно не змінюється (табл. 1). Отримані результати підтверджують дослідження інших авторів, які виявили, що хром підвищував активність каталази у селезінці щурів з гіперліпідемією [16].

Крім цього, слід відмітити, що зростання активності СОД у скелетних і серцевих м'язах та каталази – лише у скелетних м'язах, за дії цитрату хрому відбувається на тлі підвищеного вмісту ТБК-активних продуктів. Очевидно, хром в дозі 10 мкг Сг/кг у цих тканинах проявляє функцію прооксиданта, що у подальшому веде до активації ензимів АОС. Зростання активності СОД пов'язано з підвищенням біосинтезу кисневих радикалів різними оксидазами – NADPH-оксидазою, ксантинооксидазою, циклооксигеназою, ендотеліальною NO-синтазою [17]. Збільшення продукту супероксиддисмутазної реакції H_2O_2 зумовлює підвищення активності каталази. Отримані результати досліджень узгоджуються з даними літератури щодо впливу Сг на підвищення активності ензимів антиоксидантної системи [12].

Висновки

У результаті проведених досліджень встановлено, що за дії цитрату хрому, в дозі 10 мкг Сг/кг маси тіла, у самок щурів в період вагітності вміст продуктів ПОЛ у крові та тканинах не змінювався, за винятком серцевого та скелетного м'язів, де зростав вміст ТБК-активних продуктів.

За дії цитрату хрому в самок шурів підвищувалася активність супероксиддисмутази в крові (в 1,3 раза), м'язах (в 3,0 раза), мозку (в 3,2 раза), селезінці (в 3,5 раза), серці (в 6,3 раза) та каталази – в м'язах (в 1,2 раза), нирках (в 1,4 раза), селезінці (в 1,5 раза).

Список використаної літератури

1. А. с. № 1084681 СССР, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / В. В. Мирончик (СССР). — № 3468369/2813; — заявл. 08.07.82; опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.
2. Афанасьева Н. В. Результаты вагітності та пологів при фетоплацентарній недостатності різного ступеня тяжкості / Н. В. Афанасьєва, А. Н. Стрижаков // Питання гінекології, акушерства та перинатології. — 2007. — Т. 3, № 2. — С. 713.
3. Біохімічні зміни в фетоплацентарній системі мати-плацента-плід у процесі підготовки організму жінки до пологів при ускладненій вагітності / М. М. Крайнова, Т. Є. Азарнова, В. І. Розіна [та ін.] // Вісн. зростав. асоц. акуш. і гінекол. — 1998. — Т. 3. — С. 25–7.
4. Годованець Ю. Д. Плацентрана недостатність: досвід лікування, особливості адаптації новонароджених дітей / Ю. Д. Годованець, С. Є. Косілова // Клінічна та експериментальна патологія. — 2006. — Т. 5, № 4. — С. 21–25.
5. Дубинина Е. Е. Активність и изоферментный спектр супероксиддисмутази эритроцитов и плазмы крови человека / Е. Е. Дубинина, Л. Я. Сальникова, Л. Ф. Ефимова // Лаб. дело. — 1983. — № 10. — С. 30–33.
6. Коробейникова С. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК / С. Н. Коробейникова // Лаб. дело. — 1989. — № 7. — С. 8–9.
7. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
8. Agarwal A. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction / A. Agarwal, S. S. Allamaneni // *Reprod Biomed Online*. — 2004. — Vol. 9. — P. 338–347.
9. Agarwal A. Role of oxidative stress in female reproduction / A. Agarwal, S. Gupta, R. K. Sharma // *Reproductive Biology and Endocrinology*. — 2005. — Vol. 3. — P. 1–28.
10. Alscher R. G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants / R. G. Alscher, N. Erturk, L. S. Heath // *J. Exp. Bot.* — 2002. — Vol. 53. — P. 1331–1341.
11. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects / H. H. Cheng, M. H. Lai, W. C. Hou [et al] // *J. Agric. Food Chem.* — 2004. — Vol. 52. — P. 1385–1389.
12. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis / W. Yi. Chen, C. Ju. Chen, J. W. Liao [et al] // *Life Sciences*. — 2009. — Vol. 84. — P. 606–614.
13. Effects of chromium in lipid peroxidation in isolated hepatocytes / S. Ueno, N. Susa, Y. Furukawa [et al] // *Jpn. J. Sci.* — 1998. — Vol. 50. — P. 45–52.
14. Effects of chromium supplementation on growth rate and metabolism in fattening bulls / A. Pechova, J. Illek, M. Sindelar [et al] // *Acta Veterinaria Brno*. — 2002. — Vol. 71. — P. 535–541.
15. Jain S. K. Protective effects of 17-estradiol and trivalent chromium on interleukin-6 secretion, oxidative stress, and adhesion of monocytes: relevance to heart disease in postmenopausal women / S. K. Jain, K. Rogier, L. Prouty // *Free Rad. Biol. Med.* — 2004. — Vol. 37, № 11. — P. 1730–1735.
16. The effect of combined treatment with niacin and chromium (III) chloride on the different tissues of hyperlipemic rats / I. A. Atac, A. Peksela, R. Yanardag [et al] // *Drug and chemical toxicology*. — 2006. — Vol. 29, № 40. — P. 363–377.
17. The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications / M. Mohora, M. Greabu, C. Muscurel [et al] // *Romanian J. Biophys.* — 2007. — Vol. 17, № 2. — P. 63–84.

Стаття надійшла до редакції 9.05.2012

Р. Я. Искра

Институт биологии животных НААН, лаборатория биохимии адаптации и онтогенеза животных,
ул. В. Стуса, 38, Львов, 79034, Украина

**ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА ХРОМА НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КРОВИ И ТКАНЯХ БЕРЕМЕННЫХ
КРЫС**

Резюме

Исследовали влияние цитрата хрома в дозе 10 мкг Cr^{3+} /кг массы тела на содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в крови и тканях беременных самок лабораторных крыс. Установлено, что при действии цитрата хрома повышалась активность супероксиддисмутазы в крови (в 1,3 раза), мышцах (в 3,0 раза), мозге (в 3,2 раза), селезенке (в 3,5 раза), сердце (в 6,3 раза) и каталазы – в мышцах (в 1,2 раза), почках (в 1,4 раза), селезенке (в 1,5 раза) и самок в период беременности.

Ключевые слова: крыса, цитрат хрома, беременность, антиоксидантная система.

R. Ya. Iskra

Institute of Animal Biology NAAN, laboratory of adaptation biochemistry and animals ontogeny,
38, Vasyl Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

**INFLUENCE OF CHROMIUM CITRATE ON ANTIOXIDANT SYSTEM IN
BLOOD AND TISSUES OF PREGNANT RATS**

Summary

The effect of chromium citrate in dose of 10 μg Cr^{3+} /kg includes the products of lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in blood and tissues of pregnant female laboratory rats was studied. It was established that the influence of chromium citrate increased the activity of superoxide dismutase in blood (in 1,3 times), muscles (in 3,0 times), brain (in 3,2 times), spleen (in 3,5 times), heart (in 6,3 times) and catalase – in muscles (in 1,2 times), kidney (in 1,4 times), spleen (in 1,5 times) of females during pregnancy.

Key words: rat, chromium citrate, pregnancy, antioxidant system.