



Коригувальний вплив цитратів хрому і цинку на NO-синтазну активність еритроцитів щурів зі стрептозотоциновим діабетом

О. М. Слівінська¹, Р. Я. Іскра²

rudasliwa@ukr.net

¹ВНКЗ ЛОР «Львівська медична академія імені Андрея Крупинського», вул. Дорошенка, 70, м. Львів, 79007, Україна

²Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Метою досліджень було дослідити вплив цитратів хрому і цинку на NO-синтазну (NOS) активність еритроцитів щурів зі стрептозотоциновим діабетом. Було проведено три серії досліджень. Щурів першої та другої серій досліджень розділили на чотири групи (I — контрольна, II, III і IV — дослідні) по 7 тварин у кожній. Протягом чотирьох тижнів до основного раціону тварин III і IV груп у першій серії досліджень з водою додавали цитрат хрому в кількостях 10 і 25 мг Cr^{3+} /кг маси тіла, у другій серії досліджень — цитрат цинку у кількостях 20 і 50 мг Zn^{2+} /кг маси тіла відповідно. У третій серії досліджень тваринам III групи сумісно із водою додавали цитрат хрому в кількості 25 мг Cr^{3+} /кг і цитрат цинку — 50 мг Zn^{2+} /кг. Щури II дослідної групи в усіх серіях досліджень споживали чисту воду без цитратів. Через місяць у тварин усіх дослідних груп на тлі 24-годинного голодування провокували експериментальний цукровий діабет одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотину з розрахунку 65 мг/кг маси тіла з попереднім введенням нікотинамідом (230 мг/кг). Для експерименту використовували тварин з концентрацією глюкози від 14 ммоль/л. Матеріалом для досліджень була кров щурів, у якій визначали концентрацію глюкози і відносний вміст глікозильованого гемоглобіну, в еритроцитах — NO-синтазну активність: загальну, індукційну та конститутивну. У результаті проведених досліджень встановлено, що за умов стрептозотин-індукованого експериментального діабету в еритроцитах щурів II дослідної групи в обох серіях досліджень підвищувалася активність загальної та індукційної NOS, тоді як активність конститутивної NOS вірогідно не змінювалася щодо тварин контрольної групи. Введення до раціону тварин цитратів хрому і цинку як окремо, так і сумісно призводило до зниження загальної та індукційної NOS-активності порівняно з показниками тварин II групи зі стрептозотоциновим діабетом, що свідчить про позитивний вплив досліджуваних мікроелементів на NOS-активність в еритроцитах щурів. Таким чином, застосування цитратів хрому і цинку до раціону щурів із цукровим діабетом має коригувальний вплив на активність NOS, що може зменшувати згубний вплив гіперглікемії на розвиток оксидативно-нітрозативного стресу.

Ключові слова: щури, цукровий діабет, цитрати, цинк, хром, еритроцити, нітроген оксид, NO-синтаза

Цукровий діабет (ЦД) характеризується хронічною гіперглікемією, зміною вуглеводного, ліпідного і протеїнового обміну, що впливає на здоров'я і тривалість життя [1]. Гіперглікемія, яка 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 глікозильовання; гексозамінового патологічного шляху. Негативні наслідки підвищеного рівня глюкози у крові проявляються в інтенсифікації оксидативного стресу та розвитку ендотеліальної дис-

функції [11, 30]. Причинами, які призводять до розвитку цього патологічного процесу, можуть бути: відсутність синтезу або біодоступності нітроген оксиду (NO) [5] внаслідок зменшення його продукції чи інактивації АФО, які утворюються; глікозильованням протеїнів; безпосередньо з ендотелію судин [13].

Недавні дослідження показали [22], що еритроцити, крім транспортування кисню, є провідними регуляторами судинних функцій через опосередковану регуляцію вазодилатації нітроген оксидом. Дослідники припускають, що ці клітини крові є однорідними, але, по суті, вони мають різний морфологічний та

біохімічний склад, який залежить від їхнього віку та параметрів, що контролюються NO. На сьогодні еритроцити розглядаються як одні із важливих депо NO. Доведено, що вони містять функціонально активні конститутивну (cNOS) та індукцибельну (iNOS) NO-синтази, а також розчинну гуанілатциклазу та фосфодіестеразу [16, 17]. Крім того, показано наявність в цих клітинах мембранозв'язаної NOS, яка активується інсуліном. Вважають, що NO опосередковує більшість ефектів інсуліну, зокрема стимуляцію транспортування та окиснення глюкози [14]. Висунуто припущення щодо месенджерної ролі NO в реалізації ефектів інсуліну [3], проте NO здатний чинити інсуліноподібну дію і без стимуляції гормоном [12]. Крім того, доведено участь NO в підтримці здатності еритроцитів до деформації, що забезпечує їхнє проходження через мікросудини [15], однак при цьому гуанілатциклазний шлях реалізації ефектів NO лише частково задіяний у цьому механізмі [17]. В еритроцитах NO, взаємодіючи з оксигемоглобіном, призводить до утворення нітратних аніонів і метгемоглобіну. Нітроти також можуть взаємодіяти з оксигемоглобіном [6]. Гемоглобін проявляє нітрит-редуктазну активність, що означає відновлення нітритів до молекулярного NO за допомогою дезоксигемоглобіну. Ця реакція сприяє залежній від еритроцитів вазодилатації під час гіпоксії, яка часто супроводжує цукровий діабет [6].

Тому на сьогодні існує потреба в пошуку ефективних і безпечних препаратів, які би здійснювали стабілізаційний вплив на стан NOS-системи за наявності цукрового діабету. Металотерапія є сферою, до якої зростає інтерес у лікуванні цього захворювання [22]. Сполуки мікроелементів мають здатність проявляти позитивний лікувальний ефект при патогенезі й ускладненнях цукрового діабету. Було запропоновано використовувати низку сполук таких елементів, як Хром, Манган, Молібден, Купрум, Кобальт, Цинк, Вольфрам і Ванадій, як можливих допоміжних засобів у лікуванні цукрового діабету *in vivo* [2].

Тривалентний Хром (Cr) і Цинк (Zn) є есенціальними мікроелементами, які відіграють важливу роль у функціонуванні обмінних процесів в організмі. Цинк бере участь у синтезі, зберіганні та секреції інсуліну, а також у підтримці його конформаційної цілісності в гексамерній формі у β-клітинах підшлункової залози [1, 9]. Хром(III) входить до складу олігопептиду хромомодуліну, що активує дію інсуліну, сприяючи зв'язуванню гормону з рецепторами на поверхні клітини [32]. Очевидно, застосування цитратів цих мікроелементів може призводити до покращення фізіологічних біохімічних показників у крові тварин за ЦД.

Метою наших досліджень було з'ясувати вплив цитратів цинку і хрому в різних кількостях на NO-синтазну активність еритроцитів щурів зі стрептозотциновим діабетом.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на самцях білих лабораторних щурів масою 150–170 г, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН. Робота тривала протягом 2016–2018 рр. з дотриманням рекомендацій «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослід-

них та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (Київ, 2006). Було проведено три серії досліджень. У перших двох серіях щурів розділили на чотири групи: I — контрольна, II (ЦД), III і IV — дослідні, по 7 тварин у кожній. Тварини контрольної і дослідних груп мали вільний доступ до води і корму. Упродовж чотирьох тижнів до основного раціону тварин III і IV груп у першій серії досліджень з водою додавали цитрат хрому в кількостях 10 і 25 мкг Cr³⁺/кг маси тіла, у другій серії досліджень — цитрат цинку в кількостях 20 і 50 мкг Zn²⁺/кг маси тіла відповідно. У третій серії досліджень тваринам III групи із водою сумісно додавали до раціону цитрат хрому в кількості 25 мкг Cr³⁺/кг м.т і цитрат цинку — 50 мкг Zn²⁺/кг маси тіла. Тварини II групи в усіх серіях досліджень споживали чисту воду без добавок і мали експериментальний ЦД.

Тваринам II–IV дослідних груп через місяць на тлі 24-годинного голодування провокували експериментальний цукровий діабет одноразовим внутрішньочеревинним введенням стрептозотцину (*Sigma*, США) з розрахунку 65 мг/кг маси тіла із попереднім застосуванням нікотинамід (230 мг/кг) (*Acros*, Бельгія). Для підтвердження гіперглікемії проводили 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. З моменту введення діабетогенної речовини діабет виник на 3-ю добу. Забій тварин для проведення біохімічних досліджень проводили на 40-й день експерименту і на 10-у добу від введення стрептозотцину декапітацією за тіопенталового наркозу. Матеріалом для досліджень була кров щурів, у якій визначали концентрацію глюкози глюкозооксидазним методом і відносний вміст глікозилизованого гемоглобіну хроматографічним методом за допомогою тест-систем на аналізаторі *D10 Hemoglobin Testing System Bio-Rad USA; 2006* та гемолізати еритроцитів, в яких визначали активність загальної, індукцибельної і конститутивної NO-синтази (NOS, КФ 1.14.13.39) за методом, який базується на аналізі вмісту нітритів [26].

Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми *Statistica*. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стюдента.

Результати й обговорення

У процесі виконання роботи було встановлено, що за умов стрептозотцин-індукованого діабету в еритроцитах щурів II групи першої та другої серії досліджень спостерігалось вірогідне зростання загальної NOS-активності, відповідно, на 58 і 48% та iNOS-активності у 2,6 і 2,9 рази на тлі незмінної cNOS-активності щодо показників тварин контрольної групи (рис. 1).

За умов додавання цитрату хрому у кількостях 10 і 25 мкг/кг маси тіла тваринам III і IV групи на тлі стрептозотцинового ЦД спостерігалось вірогідне зниження загальної NOS на 21 і 22% та iNOS на 34 і 50% відповідно, тоді як активність cNOS вірогідно не змінювалася щодо показників тварин II групи.

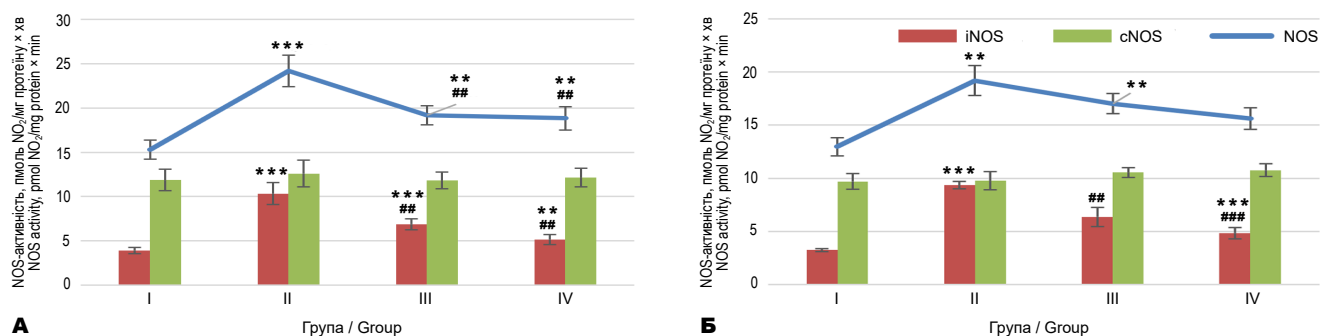


Рис. 1. Активність NO-синтаз в еритроцитах щурів з експериментальним діабетом та їх корекція цитратом хрому (А) і цинку (Б)

Примітка: тут і далі * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$, *** — $P < 0,001$ — вірогідність показників II, III, IV груп порівняно з I групою;

— $P < 0,05$, ## — $P < 0,01$, ### — $P < 0,001$ — вірогідність показників III, IV груп порівняно з II групою.

Fig. 1. Activity of NO synthases in erythrocytes of rats with experimental diabetes and their correction with chromium citrate (A) and zinc (B)
 Note: here and further * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$, *** — $P < 0,001$ — the significance of indicators in II, III, IV groups compared to I group;
 # — $P < 0,05$, ## — $P < 0,01$, ### — $P < 0,001$ — the significance of indicators in III, IV groups compared to II group.

За умов додавання цитрату цинку в кількості 20 і 50 мг/кг маси тіла тваринам III і IV груп на тлі діабету у другій серії досліджень спостерігалось вірогідне зниження активності iNOS на 32 і 48%, тоді як активність загальної NOS і cNOS вірогідно не змінювались щодо показників у тварин II групи (рис. 1).

Досліджуючи сумісний вплив цитрату хрому (25 мг/кг) і цинку (50 мг/кг) у тварин II групи з ЦД, ми виявили вірогідне підвищення активності загальної NOS на 30%, iNOS — у 2,9 раза, тоді як активність cNOS мала тенденцію до зниження порівняно з тваринами контрольної групи (табл.). У тварин III групи, до раціону яких сумісно додавали цитрат хрому (25 мг/кг) і цинку (50 мг/кг), спостерігали вірогідне зниження активності загальної NOS на 30% та iNOS — на 55% і тенденцію до підвищення активності cNOS порівняно з тваринами II групи.

У дослідженнях також встановлено, що в крові тварин II групи із експериментальним ЦД спостерігалось вірогідне підвищення концентрації глюкози в 3,3 раза і відносного вмісту глікозильованого гемоглобіну на 51% порівняно з тваринами контрольної групи. За сумісного додавання до раціону тварин III групи цитратів хрому і цинку вірогідно знижувалась концентрація глюкози (рис. 2А) і відносний вміст глікозильованого гемоглобіну (рис. 2Б) — на 41 і 48% відповідно порівняно з тваринами II (ЦД) групи. Таке зниження концен-

трації глюкози та глікозильованого гемоглобіну у крові щурів зумовлено покращенням надходження глюкози до клітин завдяки дії як хрому, так і цинку.

В основі механізму дії стрептозотину лежить низка факторів, які у сукупності призводять до загибелі β -клітин підшлункової залози. Нікотинамід частково захищає від шкідливої діабетогенної дії стрептозотину, запобігає апоптозу β -клітин, а також має захисний ефект у першій фазі вивільнення інсуліну [17].

Іншими дослідниками було встановлено, що розвиток гіперглікемії за дії стрептозотину спричиняє активацію iNOS [21]. Гіперглікемія посилює автоокиснення глюкози, неензиматичну глікацію біомолекул — протеїнів, ліпідів і ДНК [7, 20], змінює рівень NO [27].

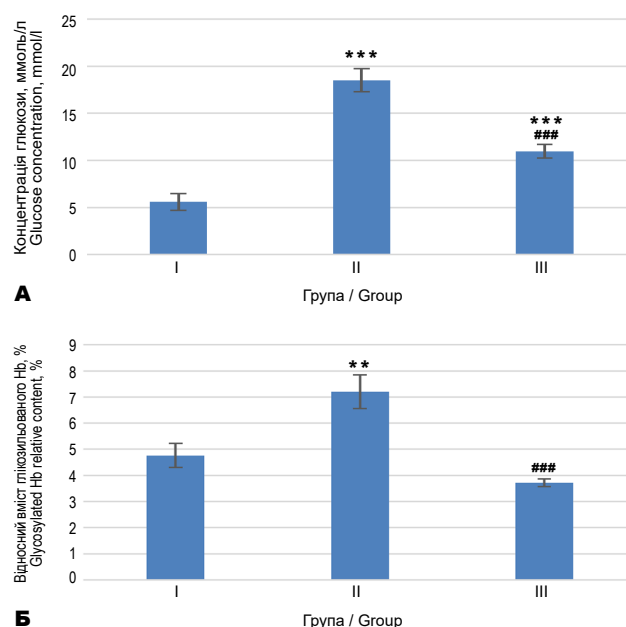


Рис. 2. Концентрація глюкози (А) і відносний вміст глікозильованого гемоглобіну (Б) у крові щурів з експериментальним діабетом і за сумісного впливу цитратів хрому та цинку

Fig. 2. Glucose concentration (A) and the relative content of glycosylated hemoglobin (B) in the blood of rats with experimental diabetes and the complex effects of chromium and zinc citrate

Таблиця. Активність NO-синтаз в еритроцитах щурів з експериментальним діабетом і за сумісної дії цитратів цинку (50 мг/кг) і хрому (25 мг/кг), пмоль NO₂/хв × мг білка (M±m, n=7)

Table. NO-synthase activity in rat erythrocytes with experimental diabetes and with the combined action of zinc and chromium citrates, pmol NO₂/min × mg protein (M±m, n=7)

| Показники Indices | Групи тварин / Groups of animals | | |
|----------------------|----------------------------------|--------------|---------------|
| | 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 |

Частина NO, який синтезується iNOS, взаємодіє з супероксидним радикалом, що призводить до утворення пероксинітриду, який викликає ендотеліальну дисфункцію, нітрує цитоплазматичні протеїни, активує процеси ліпопероксидації і спричиняє збільшення сорбітолу [8]. Це було підтверджено дослідженнями інших авторів, які встановили зниження супероксиддисмутази активності у діабетичних щурів, що могло бути зумовлене швидкою реакцією між супероксидом та NO за утворення пероксинітриду [27], рівень якого корелює з цукровим діабетом [20]. Підвищення активності iNOS також пов'язують зі збільшеним утворенням H_2O_2 і впливом прозапальних цитокінів, які активують експресію mRNA iNOS [23, 29].

Мікроелементи — такі як Zn та Cr, — мають здатність стабілізувати інсулін, його упаковку в гранули та механізми сигналізації гормону [21]. Було показано, що вміст Zn та Cr зменшується при діабеті, що зумовлено їх екскрецією за гіперглікемії та стресу [31].

Отримані дані свідчать про позитивну дію цитрату хрому на зниження iNOS-активності в еритроцитах за ЦД.

В інших дослідженнях було встановлено, що Cr(III) запобігає впливу сахарози на сигналізацію NO за гіпертензії, яка підсилена дією з високим показником глікемії. Cr(III) сприяє покращенню вазодилатаційної функції поряд з відновленням сигналів NO в артеріях [16].

Було встановлено, що сполуки цинку відновлюють до нормальних значень аргіназу та NOS-активність у сім'яній рідині безплідного пацієнта [10].

Деякі докази можливої регуляторної ролі цинку на активність iNOS існують. Цинк є важливим структурним елементом iNOS, об'єднуючи дві протеїнові субодиниці через тетраедричну координацію чотирьох цистеїнів, по два з них належать одному мономеру [18]. Встановлено, що Zn може контролювати активність iNOS [19]. Є повідомлення, що iNOS-активність в активованих макрофагах *in vitro*, яка перевищує 90%, інгібується 100 мкМ Zn [25]. Показано, що в кєратиноцитах добавки Zn зменшують рівень протеїну iNOS [33], але молекулярні механізми, відповідальні за регуляцію Цинком iNOS, ще до кінця не вивчені.

Деякі дослідники [28] у своїх експериментах не виявили механізму дії Хрому та Цинку, на відміну від інших важких металів, на синтез NO опосередковано через цитокіни (TNF- γ , TNF- α), які синтезувалися 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 [24].

Висновки

Введення до раціону щурів з цукровим діабетом цитратів хрому і цинку як окремо, так і сумісно призводить до нормалізації NOS-активності в еритроцитах та зниження рівня глюкози і глікозильованого гемоглобіну в крові, що обґрунтовує можливості їх корекції за умов цієї патології. Отримані результати можуть лягти в основу майбутніх досліджень щодо з'ясування ролі NO-залежних сигнальних шляхів у регуляції функціонального стану клітин крові за цукрового діабету.

Перспективи подальших досліджень

На перспективу планується дослідження цитратів інших мікроелементів на NO-синтазу активність у тканинах тварин за різних патологічних станів.

1. Bardsley JK, Want LL. Overview of diabetes. *Critical Care Nursing Quarterly*. 2004; 27 (2): 106–112. DOI: 10.1097/00002727-200404000-00002.
2. Bharti SK, Singh SK. Metal based drugs: current use and future potential. *Der Pharmacia Lettre*. 2009; 1 (2): 39–51. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/267961271>
3. Bhattacharya S, Chakraborty Patra S, Basu Roy S, Kahn NN, Sinha AK. Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes. *Arch. Physiol. Biochem*. 2001; 109 (5): 441–449. DOI: 10.1076/apab.109.5.441.8042.
4. Birgani GA, Ahangarpour A, Khorsandi L, Moghaddam HF. Anti-diabetic effect of betulinic acid on streptozotocinnicotinamide induced diabetic male mouse model. *Braz. J. Pharm. Sci*. 2018; 54 (2): e17171. DOI: 10.1590/s2175-97902018000217171.
5. Cockcroft JR, Webb DJ, Wilkinson IB. Arterial stiffness, hypertension and diabetes mellitus. *J. Hum. Hypertens*. 2000; 14: 377–380. DOI: 10.1038/sj.jhh.1001023.
6. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood*. 2005; 106 (2): 734–739. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0567.
7. Doddigarla Z, Parwez I, Abidi S, Ahmad J. 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: 10.4172/2254-609X.100051.
8. Drel VR. The main mechanisms of the onset and development of diabetic complications: the role of nitric stress. *Biol. Stud*. 2010; 4 (2): 141–158. DOI: 10.30970/sbi.0402.085.
9. Dunn MF. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer — a review. *Biometals*. 2005; 18: 295–303. DOI: 10.1007/s10534-005-3685-y.
10. Hadwan MH, Almashhedy LA, Alsaman ARS. Study of the effects of oral zinc supplementation on peroxyntirite levels, arginase activity and NO synthase activity in seminal plasma of Iraqi asthenospermic patients. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2014; 12: 1. DOI: 10.1186/1477-7827-12-1.
11. 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.
12. Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes*. 2001; 50 (2): 241–247. DOI: 10.2337/diabetes.50.2.241.
13. James PE, Lang D, Tufnell-Barret T, Milsom AB, Frenneaux MP. Vaso-relaxation by red blood cells and impairment in diabetes. *Circ. Res*. 2004; 94 (7): 976–983. DOI: 10.1161/01.RES.0000122044.21787.01.
14. Kahn NN, Acharya K, Bhattacharya S, Acharya R, Mazumder S, Bauman WA, Sinha AK. Nitric oxide: the “second messenger” of insulin. *IUBMB Life*. 2000; 49 (5): 441–450. DOI: 10.1080/152165400410308.
15. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Özyüman B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 2006; 107 (7): 2943–2951. DOI: 10.1182/blood-2005-10-3992.
16. Kopilas MA, Dang LNT, Anderson HDI. Effect of dietary chromium on resistance artery function and nitric oxide signaling in the sucrose-fed spontaneously hypertensive rat. *J. Vasc. Res*. 2007; 44 (2): 110–118. DOI: 10.1159/000098483.

17. Kosiakova GV, Gulaya NN. The N-stearoylethanolamine effect on the NO-synthase way of nitrogen oxide formation and phospholipid composition of erythrocyte membranes in rats with streptozotocine diabetes. *Ukr. Biochem. J.*, 2007; 79 (6): 53–59. Available at: <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journal-archiveac/2007qq/6-gfs/4428-n-no> (in Ukrainian)
18. 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. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 21276–21284. DOI: 10.1074/jbc.274.30.21276.
19. Mitchell DA, Erwin PA, Michel T, Marletta MA. S-nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 2005; 44 (12): 4636–4647. DOI: 10.1021/bi0474463.
20. Niedowicz DM, Daleke D. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* 2005; 43: 289–330. DOI: 10.1385/CBB:43:2:289.
21. Panchyshyn OB, Panasyuk NB, Biletska LP, Sklyarov AY. The changes of NO-synthases and arginase activity in pancreatic tissue under conditions of L-arginine and aminoguanidine administration in streptozotocin-induced hyperglycemia. *Tavriya Medical and Biological Messenger*. 2012; 15 (3/1 (59)): 260–262. Available at: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/44702> (in Ukrainian)
22. Pari L, Uma Maheswari J. Hypo-glycemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 68 (3): 321–325. DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00088-4.
23. Seven A, Güzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayirli M, Yigit 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. DOI: 10.1620/tjem.199.205.
24. Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC. Effects of Chromium on the immune system. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002; 34 (1): 1–7. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00596.x.
25. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. In: Meister A (ed.). *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1992; 65: 287–346. DOI: 10.1002/9780470123119.ch8.
26. Sumbaev VV, Yasynskaya IN. The effect of DDT on the nitric oxide synthase activity in the liver, lungs and brain of rats. *Modern Problems of Toxicology*. 2000; 3: 3–7. Available at: http://medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2000/00_3_1.htm (in Russian)
27. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007; 6: 662–680. DOI: 10.1038/nrd2222.
28. Tian L, Lawrence DA. Metal-induced modulation of nitric oxide production *in vitro* by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 141 (2): 540–547. DOI: 10.1006/taap.1996.0320.
29. Van den Oever I, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation*. 2010; 792393. DOI: 10.1155/2010/792393.
30. Vitak TY, Wasser SP, Nevo E, Sybirna NO. Effect of medicinal mushrooms on L-arginine/NO system in red blood cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Advances in Diabetes and Metabolism*. 2016; 4 (2): 25–31. DOI: 10.13189/adm.2016.040201. Available at: http://www.hrpub.org/journals/article_info.php?aid=3642
31. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10 (5): 339–352. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90040-A.
32. Yamamoto A, Wada O, Manabe S. Evidence that chromium is an essential factor for biological activity of low-molecular weight chromium-binding substance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 163 (1): 189–193. DOI: 10.1016/0006-291X(89)92119-0.
33. Yamaoka J, Kume T, Akaike A, Miyachi Y. Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon- γ or tumor necrosis factor- α in murine keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 2000; 23 (1): 27–35. DOI: 10.1016/S0923-1811(99)00062-6.

The corrective effect of chromium and zinc citrates on NO-synthase activity of erythrocytes in rats with streptozotocin diabetes

O. Slivinska¹, R. Iskra²
rudasliva@ukr.net

¹Andrei Krupynskyi Lviv Medical Academy,
 70 Doroshenko str., Lviv, 79007, Ukraine

²Institute of Animal Biology NAAS,
 38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

The aim of the research was to investigate the effect of chromium and zinc citrates on the NO-synthase (NOS) activity of erythrocytes in rats with streptozotocin diabetes. In three series of investigations rats were divided into four groups (I — control, II, III and IV — experimental) each one containing 7 animals. During four weeks, in the first series of investigations chromium citrate was added with water to the main diet of animals in III and IV groups in amounts of 10 and 25 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{kg}$ of body weight; in the second series, zinc citrate was added in amounts of 20 and 50 $\text{mg Zn}^{2+}/\text{kg}$ of body weight respectively. In the third series, the animals of III group received chromium citrate in amount 25 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{kg}$ of body weight and zinc citrate in amount 50 $\text{mg Zn}^{2+}/\text{kg}$ of body weight with water. The rats of II experimental group in all series received clean water with no citrates added. A month later, in animals of all experimental groups on the background of a 24-hour fasting an experimental diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin in amounts of 45 mg/kg of body weight with the previous injection of nicotinamide. Diabetes occurred on the third day. Animals with a glucose concentration of 14 mmol/L were used for the experiment. The material for the investigation was the blood of rats, in which the concentration of glucose and the relative count of glycosylated hemoglobin were determined, in erythrocytes — NO-synthase activity: general, inducible and constitutive. As a result of the conducted research, it has been found that under streptozotocin induced experimental diabetes in erythrocytes of rats of experimental group II in both series of investigations the activity of general and inducible NOS increased, while the activity of the constitutive NOS did not change compared with the animals of the control group. The introduction of chromium and zinc citrates into the animals' diet in the above mentioned doses led to the decrease in the activity of the general and inducible NOS compared with the animals of group II with streptozotocin diabetes, indicating a positive effect of the studied microelements on NOS activity in erythrocytes of rats. Thus, the use of chromium and zinc citrates in the diet of rats with diabetes has a normalizing effect on the state of NOS activity, what can reduce the harmful influence of hyperglycemia on the development of oxidative and nitrosative stress.

Keywords: rats, diabetes mellitus, citrates, chromium, zinc, erythrocytes, nitrogen oxide, NO synthase

Slivinska O, Iskra R. The corrective effect of chromium and zinc citrates on NO-synthase activity of erythrocytes in rats with streptozotocin diabetes. *Biol. Tvarin*. 2020; 22 (2): 38–42. DOI: 10.15407/animbiol22.02.038.