

UTICAJ RAZLIČITIH DOZA CINK GLUKONATA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST METFORMINA I GLIBENKLAMIDA KOD EKSPERIMENTALNO IZAZVANOG DIJABETESA KUNIĆA

AUTORI

Zorica Stanojević-Ristić 1, Julijana Rašić 1, Snežana Stević 1, Dragana Valjarević 2, Momčilo Stanić 3

1 Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet, Institut za farmakologiju sa toksikologijom Kosovska Mitrovica, Srbija
2 Univerzitet u Prištini, Prirodno-matematički fakultet, Odeak za matematiku Kosovska Mitrovica, Srbija
3 Kliničko-bolnički centar, Biohemijsko-klinička laboratorija Kosovska Mitrovica, Srbija

KORESPONDENT

ZORICA STANOJEVIĆ-RISTIĆ
Kneza Mihaila 84/4-13, 34000
Kragujevac
✉ zorica_stanojevic@yahoo.com

SAŽETAK

Imajući u vidu vezu između cinka i dijabetesa, kao i navode literaturnih podataka o njegovom antioksidativnom potencijalu, imali smo za cilj da ispitamo efekte različitih doza cinka (9,2 i 18,4 mg/dan) u kombinaciji sa metforminom i glibenklamidom, na ukupni antioksidantni status (TAS) i aktivnost enzima superoksid dismutase (SOD) kod eksperimentalno izazvanog dijabetesa kunića. Istraživanje je sprovedeno na 24 novozelandska kunića, oba pola, telesne mase 2,5-3,2 kg. Eksperimentalni dijabetes kod kunića izazvan je i.v. injekcijom aloksana (80 mg/kg TM). Tri nedelje nakon izazivanja dijabetesa, životinje su podeljene u dve grupe: I grupa tretirana je peroralno odgovarajućom dozom metformina (120 mg/kg TM), dok je II grupa kunića tretirana odgovarajućom dozom glibenklamida (0,6 mg/kg TM). Nakon washout perioda (10 t_{1/2}) kunići su dobili kombinaciju metformina tj. glibenklamida i prve doze cinka (9,2 mg). Nakon drugog washout perioda (10 t_{1/2}) kunići su dobili kombinaciju metformina tj. glibenklamida i druge doze cinka (18,4 mg). Uzorci krvi uzimani su u određenom vremenskom intervalu, po unapred utvrđenom protokolu. Vrednost TAS je značajno povećana nakon pojedinačne i kombinovane primene metformina sa cinkom u dozi od 9,2 i 18,4 mg, u odnosu na vrednost zabeleženu pre aplikacije istih (p<0,05). Zabeleženo je takođe značajno povećanje aktivnosti SOD nakon kombinovane primene cinka u dozi od 18,4 mg i metformina (tj. glibenklamida) (p<0,05). Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da jednokratne doze cinka i metformina ostvaruju značajne pozitivne efekte na parametre antioksidativnog statusa, dok je u slučaju glibenklamida ovaj efekat izostao.

Ključne reči: cink glukonat, metformin, glibenklamid, antioksidativni status, kunići

UVOD

Dijabetes melitus je oboljenje koje pogađa 2,5-3% svetske populacije i smatra se jednim od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u svetu [1]. I pored opsežnih istraživanja, etio-patogenetski mehanizmi odgovorni za nastanak ove bolesti još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni [2].

Podaci koji dovode u vezu oksidativni stres i razvoj dijabetesa tip 2 odnose se na moguće uzroke nastanka insulinske rezistencije u uslovima povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, ROS (eng. Reactive Oxygen Species), što rezultuje smanjenom osetljivošću perifernih tkiva, pre svega masnog i mišićnog, na delovanje insulina. U in vitro eksperimentima pokazano je da indukcijom oksidativnog stresa različitim sistemima koji generišu ROS dolazi do smanjenja aktivacije insulinskih receptora, posebno beta-subjedinice koja poseduje tirozin kinaznu aktivnost tj. do smanjenja auto-fosforilacije i

internalizacije insulinskih receptora, pri čemu kapacitet vezivanja insulina za receptore ostaje očuvan [3].

Oralni antidijabetici, metformin i glibenklamid (u SAD gliburid) zauzimaju značajno mesto u lečenju dijabetesa tip 2. Brojni literaturni podaci, takođe i njihova višedecenijska primena u praksi, su to i potvrdili. Rezultati novijih studija pokazuju da ovi lekovi poseduju i značajnu antioksidativnu aktivnost. U tom smislu se posebno izdvaja metformin, koji ove efekte ostvaruje povećavajući ekspresiju tioredoksina, aktivacijom AMPK-FOXO3 puta (eng. AMP-activated protein kinase - forkhead transcription factor 3). Na taj način metformin inhibiše vaskularnu inflamaciju i sprečava oštećenje endotela indukovano hiperglikemijom i slobodnim masnim kiselinama [4]. Mehanizam antioksidativnog delovanja glibenklamida nije u potpunosti objašnjen [5].

Interesovanja za cink kao elementa neophodnog za normalan rast i razvoj biljaka, životinja i ljudi, datiraju od pre nekih 130 godina. Na njegovu vezu sa dijabetesom prvi ukazuje Quarterman sa sar. 1966. godine [6] izvešta-

vajući o smanjenoj sposobnosti pankreasa da luči insulin kod pacova hranjenih obrokom deficitarnim u cinku.

Danas je poznato da cink ulazi u sastav brojnih enzima koji su uključeni u metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata, ulazi u sastav bakar-cink-superoksid dismutaze (Cu, Zn-SOD), ograničava aktivnost gvožđa u proizvodnji reaktivnih vrsta posebno hidroksilnih jona. Cink ima važnu ulogu u sintezi, skladištenju i sekreciji insulina, kao i održavanju konformacijskog integriteta insulina u heksamernoj formi. Na drugoj strani, smanjena apsorpcija cinka i hipercinkurija zabeležene u dijabetesu, ukazuju da su dijabetičari osetljiviji na deficit cinka u odnosu na zdravu populaciju [7, 8]. Kod dijabetičara, količina cinka u pankreasu je približno dva puta manja nego kod zdravih.

Kao redoks inertan metal, cink ne učestvuje u oksidaciono-redukcionim reakcijama. Za razliku od većine metala, koji favorizuju nastanak oksidativnog stresa, smatra se da cink deluje kao stabilizator membrana i da ima značajnu ulogu u antioksidantnoj zaštiti.

Na akutni efekat cinka kao antioksidansa ukazano je kasnih 80-tih godina XX veka. Predložena su dva mehanizma njegovog dejstva: 1) zaštita sulfhidrilnih grupa proteina i enzima od napada reaktivnih vrsta ili oksidacije i 2) smanjenje obrazovanja hidroksilnog radikala prevencijom obrazovanja reaktivnih vrsta ili, drugim rečima, antagonizam redoks aktivnih prelaznih metala kao što su gvožđe i bakar. Hronično davanje cinka je primer indirektnog dejstva ovog metala na oksidativni stres. Ova pozitivna uloga je verovatno u vezi sa indukcijom drugih antioksidanasa, posebno metalotioneina [9].

Sve ovo, navelo je naučnu javnost na razmišljanje da bi oralni preparati cinka mogli biti veoma korisni kod dijabetičara [10]. Međutim, ono što predstavlja poseban problem i što je predmet velikih polemika jeste koje su to optimalne doze cinka koje treba preporučiti pacijentima sa dijabetesom tip 2, koje bi ostvarile najpovoljnije efekte uz minimalni rizik od neželjenih dejstava.

Prema USA National Research Council preporučeni dnevni unos (RDA) cinka kod zdravog odraslog muškarca iznosi 11 mg [11], iako je bilo sugestija da se ove doze povećaju [12]. Prednost viših doza ogleda se u ublažavanju obima oksidativnog oštećenja, vaskularne disfunkcije, smanjenja učestalosti infekcija i jačanje kostiju.

U kliničkim studijama [13, 14] ispitivane doze cinka kreću se od 25 do 150 mg/dan kada su u pitanju pacijenti sa dijabetesom tip 2. Međutim, nalazi većine studija ukazuju da doze cinka veće od 75 mg/dan mogu da izazovu poremećaj imune funkcije i lipidnog statusa, kao i deficit bakra.

CILJ RADA

Imajući u vidu sve navedeno, cilj našeg istraživanja bio je da se ispituju i uporede efekti dve pojedinačne doze cinka (9,2 i 18,4 mg/dan) u kombinaciji sa metforminom i glibenklamidom, na ukupni antioksidantni status (TAS) i aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod eksperimentalno izazvanog dijabetesa kunića. Takođe, imali smo za cilj da ispitamo i njihovu povezanost sa nivoima glikemije i parametrima lipidnog statusa. Navedene doze cinka odgovaraju prema Clarkovoj formuli za izračunavanje doza kod životinja, dozama od 25 i 50 mg kod čoveka.

MATERIJAL I METODE

Lekovi

U ogledu su korišćeni dijetetski suplement helirani cink u obliku cink glukonata (Chelated zinc tabl. 10 mg, Natural Wealth, SAD), metformin (Siofor tabl. 500 mg, Berlin Chemie, Nemačka) i glibenklamid (Maninil tabl. 3,5 mg, Berlin-Chemie, Nemačka).

Eksperimentalne životinje

Istraživanje je sprovedeno na 24 novozelandska kunića, oba pola, telesne mase 2,5-3,2 kg. Životinje su bile smeštene u metalnim kavezima, u prostoriji koja je provetravana više puta u toku dana, sa prosečnom temperaturom 21-23°C i osvetljavana 14 sati dnevno. Tokom celog dana životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani (pelete koje proizvodi Gebi Čantavir i slama). Kunići su ostavljeni desetak dana radi adaptacije na nove uslove spoljašnje sredine, pre početka eksperimenta.

Životinje su bile tretirane u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja i regulativom Evropske Unije (EU Directive 2010/63/EU). Pre sprovedenog istraživanja pribavljena je saglasnost Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta Priština, sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici.

Eksperimentalna studija

Nakon uzimanja uzorka krvi, zdravim kunićima je izazvan eksperimentalni dijabetes i.v. injekcijom aloksana (Alloxan monohydrate, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA). Aloksan je aplikovan u dozi od 80 mg/kg TM, u usnu venu kunića, nakon 12-to časovnog perioda gladovanja metodom koju je opisao Shukla sa sar. [15]. Aloksan je pre upotrebe sveže pripremljen rastvaranjem u fiziološkom rastvoru. Kako bi izbegli hipoglikemijski šok, prvih 24 sata nakon aplikacije aloksana, pijaća voda je zamenjena 10% rastvorom glukoze.

Tri nedelje nakon aplikacije aloksana (radi postizanja stabilne hiperglikemije), životinjama je određivana koncentracija glukoze. S obzirom na različita oštećenja pankreasa sa navedenom dozom aloksana u ogled je uključeno 14 kunića sa glikemijom između 9,99 i 14,98 mmol/L, što bi odgovaralo blažem obliku dijabetesa, tj. stepenu oštećenja pankreasa kod bolesnika sa dijabetesom tip 2 [16]. Kod četiri kunića vrednost glikemije je bila iznad 14,98 mmol/L, što odgovara težem obliku dijabetesa, dok je kod šest kunića vrednost glikemije ostala u granicama referentnih vrednosti i nakon aplikacije aloksana, tako da su ti kunići isključeni iz daljeg ispitivanja.

Svim dijabetičnim kunićima su zatim uzeti uzorci krvi. Nakon toga, dijabetični kunići su podeljeni u dve grupe (po 7 kunića u svakoj): I grupa - dijabetični kunići tretirani metforminom u pojedinačnoj dozi od 120 mg/kg TM i II grupa - dijabetični kunići tretirani glibenklamidom u pojedinačnoj dozi od 0,6 mg/kg TM. Osam sati nakon primene odgovarajućeg leka uzimani su uzorci krvi.

Nakon washout perioda (10 t_{1/2}), prva grupa dijabetičnih kunića dobila je kombinaciju metformina u pojedinačnoj dozi od 120 mg/kg i cinka 9,2 mg (što prema Clarc-ovoj formuli odgovara dozi od 25 mg za čoveka).

Druga grupa dijabetičnih kunića dobila je kombinaciju glibenklamida u pojedinačnoj dozi od 0,6 mg/kg i cinka 9,2 mg. Osam sati nakon primene odgovarajuće kombinacije uzimani su uzorci krvi.

Nakon drugog washout perioda (10 t_{1/2}), prva grupa dijabetičnih kunića je dobila kombinaciju metformina u pojedinačnoj dozi od 120 mg/kg i cinka 18,4 mg (što prema Clarc-ovoj formuli odgovara dozi od 50 mg za čoveka). Druga grupa je dobila kombinaciju glibenklamida u pojedinačnoj dozi od 0,6 mg/kg i cinka 18,4 mg. Osam sati nakon primene odgovarajuće kombinacije uzimani su uzorci krvi.

Kunićima su tablete prethodno rastvarane u prečišćenoj vodi, a rastvor aplikovan u oralnu šupljinu pomoću šprica i metalnog nastavka sa zaobljenim vrhom. Novi rastvori pravljeni su svakodnevno.

Uzimanje uzoraka i metode analize

Uzorci krvi su uzimani iz ušne vene, pri čemu je bilo važno voditi računa o pravcu igle (za uzimanje uzoraka krvi pravac igle je prema vrhu uva). Za širenje krvnog suda koristili smo postupak masaže.

Analize su određivane na biohemijском analizatoru HITACHI 902 i spektrofotometru GILFORD STASAR III (LIGHTING). Određivanje smo vršili uz primenu komercijalnih kontrolnih seruma ELITROL I (normalna kontrola) i ELITROL II (patološka kontrola). Uzorci krvi su centrifugirani dva puta u trajanju od po 10 minuta na 3000 rpm, kako bi se serum u potpunosti odvojio od krvnih elemenata. Serum se potom presipao u plastične epruvete sa zatvaračem i čuvao na -20° C, do izvođenja analiza. Za uzimanje uzoraka i analize korišćene su isključivo plastične epruvete i pipete.

Za određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) i ukupnog antioksidativnog statusa (TAS), korišćeni su komercijalni testovi firme RANDOX Ltd., Velika Britanija, zasnovani na spektrofotometrijskim metodama prema Goldsteinu za SOD [17] i Milleru za TAS [18]. Za određivanje aktivnosti enzima SOD pravljen je lizat eritrocita koji je dobijen ispiranjem eritrocita četiri puta sa 3 mL 0,9% rastvora NaCl i zatim liziranjem ispiranih eritrocita sa 2 mL hladne redestilovane vode i 15-to minutnim stajanjem na +4° da bi se dovršio proces hemolize.

Za određivanje vrednosti lipidnih parametara i glikemije, korišćeni su standardni laboratorijski testovi [19].

Statistička analiza

Statistička obrada podataka rađena je primenom programa SPSS v21.0. Testiranje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti izvršeno je Student t-testom za male zavisne i nezavisne uzorke. Međusobna povezanost između merenih varijabli određivana je izračunavanjem koeficijenta linearne korelacije (r). Kriterijum za statističku značajnost bio je p<0,05.

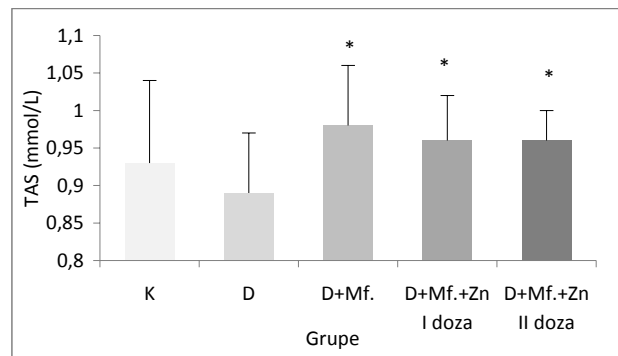
REZULTATI

Vrednost totalnog antioksidativnog statusa (TAS) kod dijabetičnih kunića nije bila statistički značajno smanjena, iako je bila niža u odnosu na vrednost zabeleženu kod zdravih kunića (Grafikon 1). Međutim, vrednost TAS

je značajno povećana nakon pojedinačne i kombinovane primene metformina sa cinkom u dozi od 9,2 mg (I doza) i 18,4 mg (II doza), u odnosu na vrednost zabeleženu pre aplikacije istih (p<0,05). Uočeno je takođe da vrednost TAS nije statistički značajno povećana nakon aplikacije metformina u kombinaciji sa različitim dozama cinka, u odnosu na vrednost zabeleženu nakon pojedinačne primene metformina.

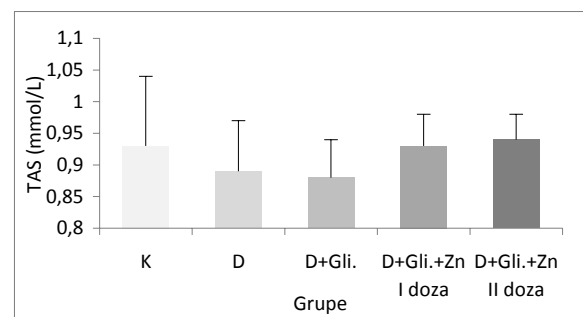
Glibenklamid pojedinačno i u kombinaciji sa različitim dozama cinka, nije izazvao statistički značajno povećanje vrednosti TAS, u odnosu na vrednost zabeleženu pre aplikacije istih (Grafikon 2). Čak šta više, zabeležena je značajno niža vrednost TAS nakon pojedinačne aplikacije glibenklamida u odnosu na vrednost zabeleženu nakon pojedinačne primene metformina (p<0.05) (podaci nisu prikazani).

Aktivnost enzima superoksid dismutaze (E-SOD) kod dijabetičnih kunića bila je značajno smanjena, u odnosu na aktivnost zabeleženu kod zdravih kunića (p< 0,001) (Grafikon 3). Zabeleženo je međutim značajno povećanje aktivnosti E-SOD nakon kombinovane primene cinka u dozi od 18,4 mg sa metforminom (p<0,05), kao i nakon kombinovane primene cinka u dozi od 18,4 mg sa glibenklamidom (p<0,05) (Grafikon 3 i 4).

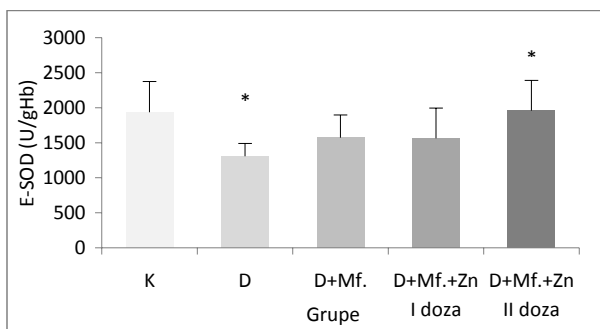


* D:D+Mf, D:D+Mf.+Zn I II doza - p<0.05

Grafikon 1. Efekti metformina pojedinačno i u kombinaciji sa različitim dozama cinka na ukupni antioksidantni status (TAS) u serumu kunića (n=7)



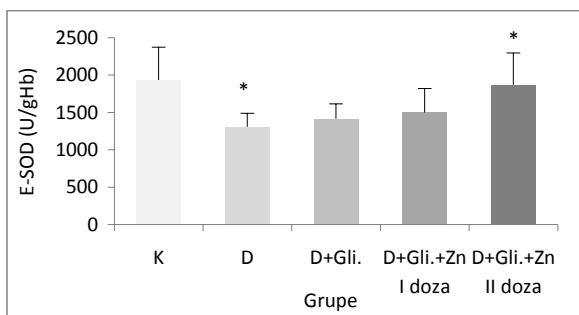
Grafikon 2. Efekti glibenklamida pojedinačno i u kombinaciji sa različitim dozama cinka na ukupni antioksidantni status (TAS) u serumu kunića (n=7)



* K:D - $p < 0.001$

** D:D+Mf.+Zn II doza - $p < 0.05$

Grafikon 3. Efekti metformina pojedinačno i u kombinaciji sa različitim dozama cinka na aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) u lizatu eritrocita kunića (n=7)



* K:D - $p < 0.001$

** D:D+Gli.+Zn II doza - $p < 0.05$

Grafikon 4. Efekti glibenklamida pojedinačno i u kombinaciji sa različitim dozama cinka na aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) u lizatu eritrocita kunića (n=7)

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da je kod dijabetičnih kunića dobijen niz značajnih korelacija između glikemije i lipidnog statusa sa parametrima antioksidativnog statusa.

Vrednost TAS je kod dijabetičnih kunića pozitivno i značajno korelirala sa vrednostima holesterola ($r=0,48$; $p < 0,001$); triglicerida ($r=0,44$; $p < 0,001$); VLDL holesterola

($r=0,44$; $p < 0,001$) i markerima aterogenog rizika - holesterol/HDL ($r=0,44$; $p < 0,001$), non HDL ($r=0,49$; $p < 0,001$), trigliceridi/HDL ($r=0,44$; $p < 0,001$), (Tabela 1).

Negativna, visoka i značajna korelacija zabeležena je između aktivnosti enzima SOD u lizatu eritrocita i vrednosti glukoze u serumu dijabetičnih kunića ($r=-0,53$; $p < 0,001$) (Tabela 1).

DISKUSIJA

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da ukupni antioksidantni status (TAS), koji predstavlja zbir svih neenzimskih antioksidanasa u serumu nije bio statistički značajno različit između dijabetičnih i zdravih kunića. Iako su rezultati kontradiktorni, najveći broj studija ukazuje na značajno smanjenje vrednosti TAS u dijabetesu tip 2 [20, 2]. Ovde se zapravo mora imati u vidu činjenica da TAS predstavlja dinamični sistem međusobno zavisnih pojedinačnih serumskih antioksidativnih parametara. Naime, smatra se da kooperacija antioksidanasa u serumu obezbeđuje veću zaštitu od štetnog uticaja reaktivnih vrsta u odnosu na svaki pojedinačni antioksidans [2]. Tu heterogenu grupu neenzimskih antioksidanasa čine visokomolekulski proteinski antioksidansi (ceruloplazmin, transferin, feritin), antioksidansi male molekulske mase koji se nalaze u ćeliji (glutacion) ili u plazmi (mokraćna kiselina, bilirubin), vitamini (vitamin C i E), kao i elementi u tragovima koji su deo aktivnog centra antioksidativnih enzima ili su značajni kofaktori za njihovu punu aktivnost, kao što su bakar, cink, mangan i selen.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da dijabetični kunići koji su dobili pojedinačnu dozu metformina, kao i kombinacije metformina sa različitim dozama cinka imaju značajno veće vrednosti TAS u odnosu na vrednosti zabeležene pre primene ispitivanih supstanci. Ovi efekti su izostali kada je u pitanju primena glibenklamida pojedinačno i u kombinaciji sa različitim dozama cinka. Pavlović sa sar. [21] takođe ukazuje da pojedinačna primena metformina ostvaruje značajne efekte u smislu poboljšanja poremećene ravnoteže između pojačane lipidne peroksidacije (smanjujući nivo MDA u plazmi i eritrocitima) i smanjene antioksidativne aktivnosti (povećavajući aktivnost katalaze i nivo glutationa u eritrocitima). Iako u literaturi postoje podaci o antioksidativnoj aktivnosti glibenklamida, mi nismo dobili

Tabela 1. Međusobna povezanost glikoregulacije i lipidnog statusa sa antioksidativnim sistemom kod zdravih i dijabetičnih kunića

Ispitivane varijable	E-SOD (r)		TAS (r)	
	Zdravi kunići	Dijabetični kunići	Zdravi kunići	Dijabetični kunići
Glukoza	0.06	-0.53***	0.01	-0.07
Holesterol	0.37	-0.09	-0.36	0.48***
Trigliceridi	0.32	-0.12	0.01	0.44***
LDL-holesterol	0.25	0.21	-0.22	-0.13
HDL-holesterol	0.37	-0.05	0.11	0.12
VLDL	0.32	-0.12	0.01	0.44***
Holesterol/HDL	0.08	-0.12	-0.38	0.44***
LDL/HDL	-0.07	0.24	-0.33	-0.26
Non HDL	0.17	-0.09	-0.14	0.49***
Trigliceridi/HDL	0.28	-0.12	-0.03	0.44***

*** K:D - $p < 0.001$

slične rezultate. Pretpostavljamo da je razlog tome što su u našem slučaju ispitivani samo efekti jednokratne primene glibenklamida.

Kada je u pitanju superoksid dismutaza, danas je poznato da je to metaloenzim koji katalizuje reakciju dismutacije superoksidnih radikala do vodonik peroksida i molekularnog kiseonika, uz promenu redoks statusa metalnog jona (bakra ili mangana) u aktivnom centru. Postoje tri izoenziemske forme ovog enzima: bakar, cink-zavisna SOD (Cu,Zn-SOD ili SOD1), mangan-zavisna SOD (Mn-SOD ili SOD2) i ekstracelularna SOD (EC-SOD ili SOD3) ali u sistemu zaštite organizma od dejstva ksenobiotika, najveću ulogu ima Cu,Zn-SOD. S obzirom da je aktivnost ekstracelularne SOD u značajnoj korelaciji sa koncentracijom cinka u serumu, pretpostavlja se da bi upravo njena aktivnost mogla da bude funkcionalni indikator nutritivnog statusa cinka kod ljudi [22].

Kada je u pitanju enzimski aktivnost superoksid dismutase (SOD), rezultati našeg istraživanja su pokazali značajno smanjenje njene aktivnosti kod dijabetičnih u poređenju sa zdravim kunićima ($p < 0.001$). Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na nepromenjenu [1] ili sniženu [23] aktivnosti SOD kod dijabetičnih životinja i bolesnika.

Dijabetični kunići koji su dobili kombinaciju metformina i cinka u dozi od 18,4 mg (što prema Clarc-ovoj formuli odgovara dozi od 50 mg za čoveka) ispoljili su značajne efekte u smislu povećanja aktivnosti SOD u odnosu na stanje zabeleženo pre aplikacije ispitivanih supstanci ($p < 0,05$). Ista situacija je zabeležena i kada su u pitanju dijabetični kunići koji su dobili kombinaciju glibenklamida i cinka u dozi od 18.4 mg. Ovo ukazuje na značajni antioksidativni potencijal cinka, pri primeni viših doza.

Međutim, iako je poznata udruženost deficita cinka sa smanjenom aktivnošću SOD i većom osetljivošću na oksidativni stres zbog povećane produkcije reaktivnih vrsta, interesantna su otkrića koja ukazuju da i visoke doze cinka mogu da smanje aktivnost Cu,Zn-SOD zbog ograničavanja biorasploživosti bakra [24].

Kada je u pitanju povezanost antioksidativnog sistema sa glikoregulacijom i lipidnim statusom, u našoj studiji dobijene vrednosti TAS kod dijabetičnih i zdravih kunića nisu statistički značajno korelisale sa glikemijom. Ovo se može tumačiti vremenski uslovljenim promenama

pojedinačnih konstituenasa ukupnog antioksidantnog statusa, što se opisuje u literaturi [25, 26]. Međutim, zabeležena je negativna i značajna korelacija između aktivnosti SOD i glikemije, što se verovatno dovodi u vezu sa negativnim uticajem hiperglikemije i glikozilacije proteina na katalitičku aktivnost enzima SOD.

Pozitivna korelacija između TAS i markera ateroskleroze, mogla bi ukazati na moguću povezanost između viših koncentracija lipida, koje dovode do ubrzane lipidne peroksidacije i potencijalno većeg smanjenja organskih hidroperoksida kao posledica povećanog nivoa TAS.

ZAKLJUČAK

Rezultati našeg istraživanja su pokazali na prednost viših doza cinka u smislu značajnog povećanja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod dijabetičnih kunića. Metformin i glibenklamid nisu ispoljili slične efekte, na šta ukazuje njihova pojedinačna jednokratna primena.

Nasuprot tome, kada je u pitanju uticaj ispitivanih lekova na ne-enzimski deo antioksidativnog sistema, može se uočiti da metformin ostvaruje značajne efekte u smislu povećanja totalnog antioksidantnog statusa kod dijabetičnih kunića.

Koncentracija glukoze negativno korelira sa aktivnošću enzima superoksid dismutase, dok markeri ateroskleroze pozitivno i značajno koreliraju sa totalnim antioksidantnim statusom. Promenjene vrednosti ispitivanih parametara i raznovrsnost korelacija ukazuju na značajno izmenjenu antioksidativnu zaštitu kod dijabetičnih kunića.

LITERATURA

1. Kostić N, Čaparević Z, Ilić S. Antioksidantni status bolesnika sa dijabetesom tip 2 u odnosu na mikrovaskularne komplikacije. *Srpski Arhiv za celokupno lekarstvo*. 2007; 135(3-4):143-6.
2. Đorđević G, Đurić S, Apostolski S, Đorđević V, Živković M. Totalni antioksidativni kapacitet plazme kod bolesnika sa dijabetesom melitusom tip 2 i distalnom simetričnom polineuropatijom. *Vojnosanitetski preglod*. 2008;65(9):663-9.
3. Pavlović D, Đorđević V, Kostić G. Ćelijska signalna transdukcija - modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslav. Med. Biohem*. 2002;21:69-84.
4. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 2002;51:159-67.
5. Chukwunonso Obi B, Chinwuba Okoye T, Okpashi VE, Nonye Igwe C, Olisah Alumanah E. Comparative Study of the Antioxidant Effects of Metformin, Glibenclamide, and Repaglinide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Res*. 2016;2016:1635361.
6. Quaterman J, Mills CF, Humphries WR. The reduced secretion of, and sensitivity to insulin in zinc-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1966;25(3):354-8.
7. Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE. Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J Med*. 1983;75:273-7.
8. Cunningham JJ, Fu A, Mearkle PL, Brown RG. Hyperzincuria in individuals with insulin-dependent diabetes mellitus: concurrent zinc status and the effect of high-dose zinc supplementation. *Metabolism*. 1994;43:1558-62.

9. Đukić MM, Oksidativni stres, slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. Mono i Manjana, Beograd, 2008.
10. Foster M, Samman S. Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Anti-oxid Redox Signal.* 2010;13:1549-73.
11. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol.* 2006;20:3-18.
12. Peretz A, Papadopoulos T, Willems D. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. *J Trace Elem Med Biol.* 2001;15:175-8.
13. Al-Marouf RA, Al-Sharbatti SS. Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics. *Saudi Med J.* 2006;27:344-50.
14. Parham M, Amini M, Aminorroaya A, Heidarian E. Effect of zinc supplementation on microalbuminuria in patients with type 2 diabetes: a double blind, randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *Rev Diabet Stud.* 2008;5:102-9.
15. Shukla R, Anand K, Prabhu KM, Murthy PS. Hypolipidemic effect of water extract of *Ficus bengalensis* in alloxan induced diabetes mellitus in rabbits. *Ind. J. Clin. Biochem.* 1995;10(2):122-4.
16. Babu BV, Moorti R, Pugazhenth S, Prabhu KM, Murthy PS. Alloxan recovered rabbits as animal model for screening for hypoglycemic activity of compounds. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 1988;25(6):714-718.
17. Goldstein S, Michel C, Boors A, Saran M, Czapsky G. A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radical Biol. Med.* 1988;4:295-303.
18. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. *Clinical Science.* 1993;84:407-412.
19. Greilling H, Gressner AM. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer, 1995.
20. Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel W., Souka S, Lowe JE. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism.* 1999;48(11):1414-7.
21. Pavlovic D, Kocic R, Kocic G, Jevtovic T, Radenkovic S, Mikic D., Stojanovic M., Djordjevic PB. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2000;2:251-6.
22. Paik HY, Joung H, Lee JY, Lee HK, King JC, Keen CL. Serum Extracellular Superoxide Dismutase Activity as an Indicator of Zinc Status in Humans *Biological Trace Element Research.* 1999; 69:45-57.
23. Duzguner V, Kaya S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense system of the alloxan-induced diabetic rabbit. *Free radical Biology and Medicine.* 2007;42:1481-6.
24. Cousins RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev.* 1985;65:238-309.
25. Sasari M, Nyakas C. Time dependent changes in oxidative metabolism during chronic diabetes in rats. *Acta Biologica Szegediensis.* 2003;47:153-8.
26. Majithiya JB, Balaraman R. Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(5):697-705.

ENGLISH

EFFECTS OF DIFFERENT DOSES OF ZINC GLUCONATE ON ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF METFORMIN AND GLIBENCLAMIDE ON EXPERIMENTALLY INDUCED DIABETES IN RABBITS

Zorica Stanojević-Ristić 1, Julijana Rašić 1, Snežana Stević 1, Dragana Valjarević 2, Momčilo Stanić 3
 1 University of Pristina, Faculty of Medicine, Institute of Pharmacology and Toxicology Kosovska Mitrovica, Serbia
 2 University of Pristina, Faculty of Sciences, Department of Mathematics Kosovska Mitrovica, Serbia
 3 Clinical-hospital center, Biochemical-Clinical Laboratory Kosovska Mitrovica, Serbia

SUMMARY

It is well known that there is a relationship between the zinc and diabetes, and its antioxidant potential. Based on that, the aim of this paper is to investigate the effects of different doses of zinc (9,2 and 18,4 mg / day) in combination with metformin and glibenclamide, to the total antioxidant status (TAS) and the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) in experimentally-induced diabetic rabbits. The study was conducted on 24 New Zealand rabbits of both sexes, body weight 2,5 to 3,2 kg. In rabbits, experimental diabetes was induced i.v. injection of alloxan (80 mg / kg body weight). Three weeks after causing diabetes, the animals were divided into two groups: first group was treated oral with metformin, an appropriate dose (120 mg / kg body weight), while the second group of rabbits was treated with a suitable dose of glibenclamide (0,6 mg / kg BW). After the washout period (10 t1/2), the rabbits were treated with metformin and a first dose of zinc (9,2 mg) combination, i.e. glibenclamide and zinc (9,2 mg). After another washout period (10 t1/2) the rabbits were treated with metformin and a second dose of zinc (18,4 mg) combination, i.e. of

glibenclamide and zinc (18,4 mg). Blood samples were taken in a specified time interval. The TAS value was significantly increased after administration of metformin, single and in combination with zinc, in doses of 9,2 and 18,4 mg, with respect to the value recorded before their application ($p < 0.05$). Also, it is noted a significantly increased SOD activity after administration of metformin (i.e., glibenclamide), and zinc in combination, in a dose of 18,4 mg ($p < 0.05$). This indicates that zinc and metformin have a significant positive effects on the parameters of antioxidative status, but with glibenclamide this effect did not occur.

Keywords: zinc gluconate, metformin, glibenclamide, antioxidative status, rabbits
