

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ»**

ЛУКАШІВ ОЛЬГА ЯРОСЛАВІВНА

УДК 577.1:547.1'1]:57.084:582.263

**ОТРИМАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
СЕЛЕНХРОМЛІПІДНИХ КОМПЛЕКСІВ З *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ.
ЗА ДІЇ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ СТРЕПТОЗОТОЦИНУ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Тернопіль – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Тернопільському національному педагогічному університеті імені Володимира Гнатюка Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор
Грубінко Василь Васильович,
Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка МОН України,
завідувач кафедри загальної біології та методики навчання природничих дисциплін

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Калінін Ігор Васильович,
Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова МОН України,
завідувач кафедри хімії

кандидат біологічних наук, доцент
Лихацький Петро Григорович,
Державний вищий навчальний заклад
«Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»,
доцент кафедри медичної біохімії

Захист дисертації відбудеться «30» січня 2018 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 в ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» за адресою: 46000, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1.

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» за адресою: 46000, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розісланий «29» грудня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 58.601.04
кандидат біологічних наук, доцент

Т.Я. Ярошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним з актуальних питань сучасності є розробка та стандартизація препаратів біологічно активних речовин (БАР) рослинного, тваринного й мінерального походження, отриманих з натуральних продуктів (Мерецький В.М., 2006; Abd El., El-Baroty G.S., 2013). Значний інтерес становить використання БАР з водоростей (Золоторьова О.К. та ін., 2008; Abd El., El-Baroty G.S., 2013), які є малотоксичними, діють м'яко та можуть використовуватися тривалий час.

Унікальні біохімічні складові водоростей (Золоторьова О.К. та ін., 2008) здатні призупиняти розвиток цукрового діабету (ЦД), регулювати метаболізм при діабеті та його ускладненнях за рахунок впливу на обмін глюкози, збалансування прооксидантно-антиоксидантних процесів та запобігання окисному ушкодженню компонентів клітини. Біологічно активні сполуки водоростей також можуть поглинати і накопичувати екзогенні мікроелементи, включаючи їх до складу пігментів, білків і ліпідів (Минюк Г.С., Дробецкая И.В., 2008; Abd El., El-Baroty G.S., 2013). Завдяки комплексній терапії БАР з хімічними препаратами досягається стабілізація стану хворих, інколи зменшення дози інсуліну чи гіпоглікемічних засобів (Маслов Д.Л. и др., 2002; Внутрішні ..., 2004).

Ключова роль хрому полягає в регуляції метаболізму вуглеводів, оскільки Cr(III) є компонентом фактора толерантності до глюкози (Тронько М.Д., Щербак О.В., 2009; Sundaram B, 2012). Хром також бере участь у нормалізації функціонування серцево-судинної системи, підвищує імунітет, збільшує тривалість та якість життя хворих із ЦД (Снітинський В.В. та ін., 1999; Cefalu W.T., Hu F.V., 2004; Cheng H. et. al., 2004; Jain S.K. et. al., 2007). Поповнення цього мікроелемента аліментарним шляхом не завжди можливе, тому біологічно активні добавки (БАД), особливо водоростеві, до складу яких входить хром (Щербак С.О., 2004; Jeejeebhoy K.N, 1999), знайшли широке застосування в клінічній практиці.

Селен є життєво необхідним мікроелементом, що забезпечує функціонування глутатіонпероксидази (Барабой В.А., Шестакова Е.Н., 2004; Седов К.Р., Бобовская А.Г., 2007; Тронько М.Д., Щербак О.В., 2009; Selenium, 2003).

У зв'язку з цим, пошук і створення нових препаратів та БАД для корекції метаболічних порушень при цукровому діабеті, які б поєднували в собі високу безпеку та ефективність, залишається на даний час важливим.

Отже, відтворення експериментальної моделі ЦД 2-го типу на тлі ожиріння та дослідження біологічної дії селенхромліпідного комплексу із хлорели має важливе значення для подальшого розуміння ролі БАД із водоростей у корекції метаболічного дисбалансу за цукрового діабету.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана на кафедрі загальної біології та методики навчання природничих дисциплін Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка в межах науково-дослідних тем Міністерства освіти і науки України «Регуляція зовнішніми факторами продукування біологічно активних речовин водними організмами в аквакультурі» (держреєстрація № 0116U002574) та «Розроблення умов та технології регульованого біосинтезу селенметалвмісних біологічно активних речовин одноклітинними водоростями» (держреєстрація № 0114U003079).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було вивчити особливості накопичення та вплив сполук хрому Cr(III) в комплексі із селеном Se(IV) на біосинтез і накопичення селенхромвмісного біологічно активного комплексу з ліпідами *Chlorella vulgaris* Beij., а також проаналізувати метаболічні реакції організму за дії ліпідного та селенхромліпідного комплексів із *Ch. vulgaris* у здорових щурів та на моделі цукрового діабету 2-го типу.

Для досягнення визначеної мети в дисертації були поставлені такі **завдання**:

1. З'ясувати концентраційно-часову залежність та кінетику поглинання йонів хрому спільно із селенітом клітинами та ліпідами хлорели;
2. Дослідити вміст ліпідів та селену і хрому за спільного впливу натрію селеніту та хрому хлориду у них;
3. Отримати в умовах аквакультури селенхромліпідну субстанцію з хлорели та дослідити її потенційну біологічну активність;
4. З'ясувати вплив ліпідного та селенхромліпідного комплексів із хлорели на обмін речовин у здорових тварин в експерименті;
5. Дослідити основні показники вуглеводного та ліпідного обмінів у щурів з моделлю ЦД 2-го типу за введення селенхромліпідної субстанції з хлорели та за введення неорганічних сполук хрому та селену;
6. Оцінити стан антиоксидантної системи, показників пероксидного окиснення ліпідів та енергетичного обміну у щурів з діабетом за умов введення селенхромліпідного комплексу з *Ch. vulgaris* та неорганічних сполук хрому і селену.

Об'єкт дослідження – ліпідний обмін у клітинах *Chlorella vulgaris* за спільної дії натрію селеніту та хрому(III) хлориду; біохімічні механізми дії ліпідного та селенхромліпідного комплексів із *Ch. vulgaris* на обмін речовин у здорових щурів та за умов розвитку стрептозотоцин-нікотинамід-індукованого ЦД 2-го типу.

Предмет дослідження – утворення у клітинах *Chlorella vulgaris* та біологічна активність комплексів ліпідів із селеном та Cr(III); окремі показники вуглеводного, ліпідного та енергетичного обмінів, прооксидантно-антиоксидантної системи у здорових щурів та за умов експериментального ЦД 2-го типу.

Методи дослідження: загальноприйняті методи культивування мікроводоростей, експериментальні, біохімічні, біометричні методи, хроматографічні, методи статистичної обробки отриманих даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено здатність та оптимальні умови вирощування і включення селену та хрому у *Chlorella vulgaris* Beij. ССАР-211/11в за спільного культивування з натрію селенітом в концентрації 10,0 мг Se(IV)/дм³ та хрому хлоридом в концентрації 5,0 мг Cr(III)/дм³ зі збільшенням вмісту селену у 3,5 раза, а хрому – у 5,0 разів щодо контролю.

Знайшли розвиток уявлення про концентраційно- і часозалежний етапний механізм накопичення селену та хрому у клітини водоростей.

Вперше з *Ch. vulgaris* в умовах аквакультури виділено стабільні ліпідний та селенхромліпідний комплекси, що містили селен і хром, і мали високу біологічну активність. За умови щоденного введення впродовж 14 діб досліджуваних субстанцій в організмі здорових тварин не виявлено інтоксикації, активувався енергетичний метаболізм та підвищувалася антиоксидантна активність. Вперше встановлено, що за експериментального цукрового діабету введення селенхромліпідного комплексу знижує показники загальної інтоксикації, рівень

глюкози та фруктозаміну у крові, покращує ліпідний обмін, стабілізує оксидативний статус у тканинах.

Отримано позитивне рішення на патент України «Спосіб отримання біологічно активного селенхромліпідного комплексу з хлорели».

Практичне значення одержаних результатів. Уперше показано, що біотехнологічно ефективними для отримання селенхромліпідних субстанцій є культивування хлорели з натрію селенітом та хрому(III) хлоридом у концентрації Cr(IV) – 5,0 мг/дм³.

Виділені ліпідний та селенхромліпідний комплекси, при введенні яких в організм здорових щурів не викликали ендогенної інтоксикації в організмі, у печінці та сироватці крові тварин пригнічувалися прооксидантні процеси, активізувалися антиоксидантний статус, сукцинатдегідрогеназна та цитохромоксидазна активності, глутаматдегідрогеназний шлях утворення глутамату. За введення селенхромліпідного комплексу щурам з експериментальним цукровим діабетом у печінці та сироватці крові тварин покращувалися показники енергетичного обміну, стабілізувалися вуглеводний та ліпідний обміни, активувався антиоксидантний захист, що є підставою вважати цей комплекс ефективним як профілактичний та лікувальний засіб при цукровому діабеті 2-го типу.

Результати роботи впроваджені в навчальний процес на кафедрах: біологічної та медичної хімії імені Г.О. Бабенка ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет МОЗ України», біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України, хімії Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова МОН України, медичної біохімії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України».

Особистий внесок здобувача полягає у самостійному опрацюванні наукової літератури з досліджуваної проблеми, оволодінні необхідними методами досліджень, виконанні всього обсягу експериментальних робіт, здійсненні статистичної обробки отриманих результатів. Здобувач особисто або у співавторстві підготувала до друку наукові праці, у яких викладені основні положення дисертації, самостійно сформулювала основні положення та висновки, задекларовані в роботі.

Апробація результатів дисертації. Основні результати, представлені в дисертації, обговорювалися на: IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2016); Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» (Москва, Россия, 2016); XII International scientific-applied conference «Biotechnology for agriculture and environmental protection» (Odessa, 2016); III Міжнародній науково-практичній конференції «Стан природних ресурсів, перспективи їх збереження та відновлення» (Дрогобич, 2016); Всероссийской молодежной гидробиологической конференции «Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (Борок, Россия, 2016); IX Международному конгрессе «Битехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017); I Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції (Бердянськ, 2017); 17-й международной научной конференции «Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, Беларусь, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання медицини і

біології» (Полтава, 2017); VII International Weigl conference (Lviv, Ukraine, 2017); International scientific conference «Natural Resources of Border Areas under a Changing Climate» (Chernihiv, Ukraine, 2017); II Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми функціонування та підвищення біопродуктивності водних екосистем» (Дніпро, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опублікована 21 наукова праця, з них 4 – у фахових виданнях України (із них 1 цитована у Web of Science), 3 – в іноземних періодичних виданнях (із них 1 цитована у Scopus), 1 – у науковому виданні України, 13 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій, конгресів та з'їздів.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на 179 сторінках друкованого тексту (основна частина – на 130 сторінках) і складається із таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, 2 розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, що становить 311 посилань (164 – кирилицею та 147 – латиницею) та додатки. Робота ілюстрована 14 таблицями та 24 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. В експериментальних дослідженнях, виконаних в 2 етапи, використано статевозрілих білих безпородних шурів-самців у кількості 135 тварин з початковою масою 160–180 г. Утримання та маніпуляції із тваринами проводили у відповідності до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), а також керувалися положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Комісія з питань біоетики ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» порушень морально-етичних норм при проведенні досліджень не виявила (протокол № 41 від 01.06.2017 р.). Експериментальну частину роботи виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» (свідоцтво про атестацію № 053/13, видане 04.03.2013 р.).

Тварин утримували в звичайних умовах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм з доступом до води *ad libitum*. Об'єктом досліджень була альгологічно чиста культура *Chlorella vulgaris* Beij. ССАР-211/11в, яку культивували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема №11 (22–25°C, 2500 лк впродовж 16 год/добу) (Романенко В.Д., 2004).

В умовах експерименту до культури водоростей додавали водний розчин натрію селеніту (Na_2SeO_3) в розрахунку на кількість йонів Se(IV) – 10,0 мг/дм³ (Vinjarska G.V et. al., 2014) та розчин $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в розрахунку на вміст Cr(III) – 5,0; мг/дм³. Біомасу живих клітин відбирали на 7-му добу культивування.

Для вивчення кінетичних параметрів накопичення хрому у клітинах та ліпідах водоростей додавали розчин $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в розрахунку на вміст Cr(III) 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 мг/дм³ та проводили відбір зразків біомаси на 1, 3, 6, 12, 24, 72, 168, 240 годинах. Контролем була культура, вирощена без додавання натрію селеніту та солі хрому.

Вміст селену визначали спектрофотометрично з о'-фенілєндиаміном (Дедков Ю.М.; Мусатов, А.В., 2002), а хрому – за допомогою хромазурулу S (Яцків О.С.; Пацай І.О., 2009).

Ліпіди екстрагували сумішню хлороформ-метанол (2:1) згідно (Hokin L.E.; Nехum T.D., 1992) та розділяли на класи методом одномірної тонкошарової хроматографії.

Досліджували біологічну активність ліпідного та селєнхромліпідного комплексів, склад і структура яких встановлені методами тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії (рідинний хромато-мас-спектрометр Agilent 1200 SL/DAD/FD/MSD 6130; «Agilent Technologies», USA) на метаболізм у здорових щурів та з експериментальним цукровим діабетом 2-го типу.

При здійсненні експерименту на здорових щурах тварини було розділено на три групи. Контрольним щурам вводили внутрішньошлунково щоденно на протязі 14 діб 1 мл фізрозчину. Щурам другої групи вводили аналогічно ліпідну суспензію з хлорели на 1 % крохмальному розчині, що містила 0,5 мг ліпідів в 1 мл суспензії, тваринам третьої групи – виділений із хлорели ліпідний комплекс, що містив 1,85 мкг селєну, 1,1 мкг хрому і 0,5 мг ліпідів на 1 мл суспензії.

Цукровий діабет індукували відтворення моделі аліментарного ожиріння, яке здійснювали шляхом 4-тижневого призначення висококалорійної дієти з додаванням глутамату натрію (дієта #С 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ) (Марущак М.І. та ін., 2012) з наступним одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), який вводили одноразово на цитратному буфері (65 мг/кг) та превентивно – нікотинамїду (230 мг/кг). Контрольним щурам вводили тільки цитратний буфер. Процес відтворення аліментарного ожиріння піддавали контролю (Jeяakumar S.M. et al., 2006).

Для внутрішньошлункового введення щурам з ЦД наважку селєнхромліпідного комплексу розчиняли в 1 % водному розчині крохмалю, 1 мл якого у містив 0,6 мкг селєну, 1,05 мкг хрому у 0,5 мг ліпідів. Тварини були поділені на 7 груп: 1 група – інтактний контроль (К); 2–7 – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЦД): 2 – тварини з ЦД, виведені з експерименту на 21 день (ЦД1); 3 – тварини з ЦД, виведені з експерименту на 35 день (ЦД2); 4 – тварини з ЦД + профілактичне введення селєнхромліпідного комплексу протязом 21 дня (ЦД+П); 5 – тварини з ЦД + введення селєнхромліпідного комплексу з лікувальною метою, яке розпочиналося з 21 дня від моменту введення цитотоксину протязом 14 діб (ЦД+Л1); 6 – тварини з ЦД + лікувально-профілактичне введення селєнхромліпідного комплексу з 1 по 35 добу (ЦД+П+Л1); 7 – тварини з ЦД + введення крохмального розчину хрому хлориду $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ та натрію селєніту Na_2SeO_3 з лікувальною метою з 21 по 35 добу (ЦД+Л2), який в перерахунку на йони Se(IV) і Cr(III) містив ідентичну дозу цих мікроелементів.

Тваринам I та II груп впродовж 21 доби, а тваринам III групи впродовж 35 діб вводили *per os* фізіологічний розчин.

Евтаназію тварин здійснювали під тіопенталовим наркозом.

Для проведення біохімічних досліджень використовували сироватку крові, цільну кров та гомогенат печінки тварин. Ступінь ендогенної інтоксикації визначали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) (Габриєлян Н.І., 1985). Активність вільнорадикальних процесів оцінювали за вмістом активних форм кисню (АФК) (Li W. et al., 2012), дієнових кон'югатів (ДК) (Колєсова О.Е. та ін., 1984) і ТБК-

активних продуктів (ТБК-АП) (Владимиров Ю.А. та ін., 1972). Стан антиоксидантної системи вивчали за активністю каталази (КТ, КФ 1.11.1.6) (Королюк М.А. та ін., 1988), супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) (Чевари С. та ін., 1985), глутатіонпероксидази (ГПО, КФ 1.11.1.9) (Круглікова Г.О. та ін., 1976) та вмістом відновленого глутатіону (ВГ) (Ellman G.L., 1959). У печінці також визначали активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) (Прохорова М.И., 1982); цитохромоксидази (ЦО, КФ 1.9.3.1) (Straus, 1954); глутаматдегідрогенази (ГДГ, КФ 1.4.1.2) (Софьин А.В., 1984).

Розвиток цукрового діабету 2-го типу контролювали за вмістом глюкози у крові (ммоль/дм³), яку визначали глюкометром «Accu-Chek Active» фірми «Roche Diagnostics GmbH» (Німеччина), рівнем фруктозаміну (Johnson R.N et al., 1982), наявністю глюкози («Глюкотест», %) та кетонових тіл у сечі («Ацетонтест», ммоль/дм³), які визначали за допомогою індикаторних смужок «ПВП «Норма». Глюкозотолерантний тест проводили на 14 день з моменту введення стрептозоточину (Стефанов О.В., 2001). Кількість білків визначали за Lowry (Lowry O.H. et al., 1951). Аналіз ліпідного профілю (концентрація загального холестеролу (ЗХ), ліпопротеїнів високої (ЛПВЩ) та низької щільностей (ЛПНЩ) проводили за допомогою набору реагентів «СпЛ».

Одержані експериментальні дані опрацьовані методами варіаційної статистики за допомогою програми Statistica 6.0 з використанням t-критерію Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990).

Результати досліджень та їх обговорення

Ліпідний обмін у *Chlorella vulgaris* за дії натрію селеніту та хрому (III) хлориду. Результати дослідження показали, що у клітинах *Chlorella vulgaris* за спільного культивування з натрію селенітом в концентрації 10,0 мг Se(IV)/дм³ та хрому хлоридом (5,0 мг Cr(III)/дм³) на 7 добу загальний вміст ліпідів зростає на 9,91 % порівняно з контрольними показниками. Щодо фракційного складу, то вміст ТАГ, ДАГ і ФЛ збільшується на 20,5 %, 4,4 % та 17,6 % відповідно, а вміст НЕЖК знижується на 24 % порівняно з контролем.

Накопичення хрому та селену клітинами та ліпідами *Ch. vulgaris* за спільної дії хрому хлориду в різних концентраціях та селеніту натрію. Досліджено, що впродовж 7 діб інкубації водоростей із селенітом та йонами хрому спостерігалось накопичення селену та хрому клітинами *Ch. vulgaris*. Так, за дії обох елементів вміст селену зростав у 3,46 раза, а хрому – у 5,01 разів щодо контролю.

Найактивніша акумуляція хрому біомасою за концентрацій 2,5 мг/дм³; 5,0 мг/дм³ та 7,5 мг/дм³ відбувається впродовж 3 год (рис. 1).

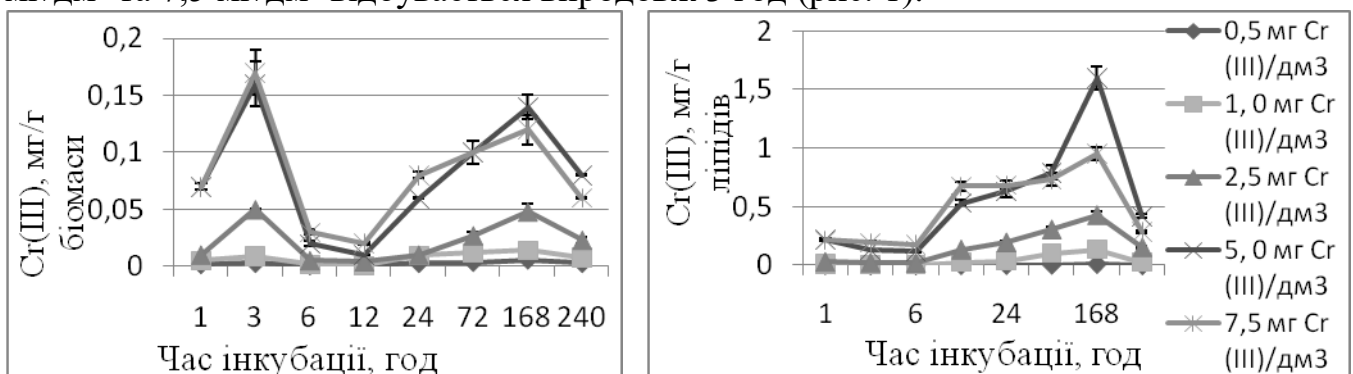


Рис. 1. Накопичення йонів хрому клітинами та ліпідами *Ch. vulgaris*.

Після цього до 12 год має місце зниження акумуляції металу з подальшим відновленням до 168 год, після чого знову відбувається зниження інтенсивності накопичення металу.

Активне накопичення Cr(III) у ліпідах має місце щонайменше після 6 год інкубації за дії всіх досліджуваних концентрацій. Далі до 168 год відбувається інтенсивне накопичення металу, після чого процес поглинання хрому ліпідами водоростей зворотній.

Щодо кінетичних показників, то на початкових етапах досліду процес був енергетично залежним, на що вказують високі енергія активації та константа зв'язування (K). Подальше зниження значення K може свідчити про поступове насичення центрів зв'язування хрому в ліпідах. Критичними фазами накопичення хрому ліпідами є 3–6 год та насамкінець культивування (240 год.).

Отже, накопичення хрому носить флуктуаційний характер, має виражену концентраційну та часову залежність і складається з чотирьох етапів: адаптація клітин до нового фактору; етап активного накопичення хрому; пригнічення контрольованої фіксації металу в клітинах в цілому і ліпідах; етап відновлення накопичення, який є неконтрольованим клітиною і супроводжує її загибель.

Активна акумуляція селену біомасою хлорели у присутності йонів хрому в концентрації $5,0 \text{ мг/дм}^3$ здійснюється з 12 год культивування і стрімко зростає до 168 год, після чого відбувається зменшення акумуляції селену (рис. 2).

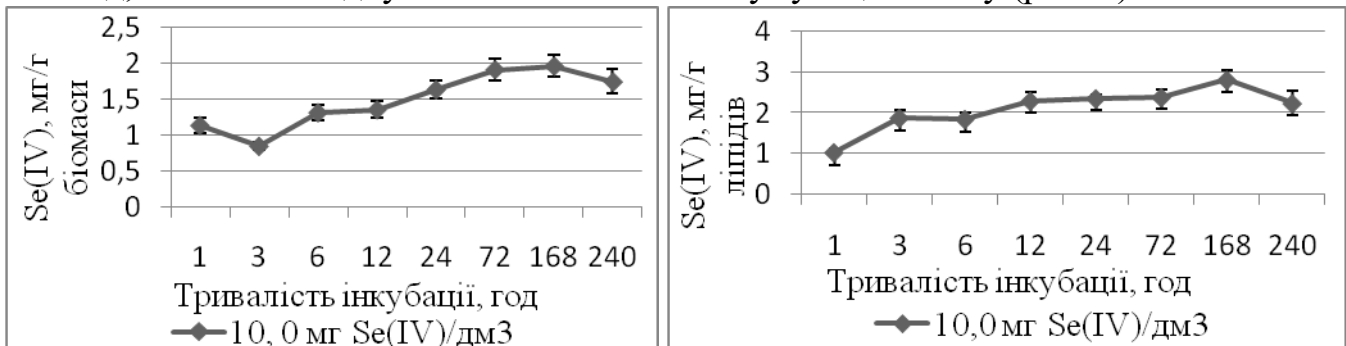


Рис. 2. Накопичення селену клітинами та ліпідами за спільного культивування з йонами хрому ($5,0 \text{ мг/дм}^3$) у *Ch. vulgaris*.

Результати дослідження акумуляції селену ліпідами *Ch. vulgaris* показали, що упродовж перших 3 год культивування має місце активне включення мікроелементу до складу останніх. Після 6 год відбувається інтенсивне накопичення селену ліпідами водорості до 168 год, після чого – знижується. Накопичення селену підлягає закономірності Міхаеліс-Ментен упродовж всього часу експозиції, виявлене зменшення значення V_{max} та збільшення значення K свідчить про зменшення спорідненості до селеніту компонентів йон-транспортної системи, що позначається на значенні $E_{\text{акт}}$ процесу, яка збільшується від 24 до 72 год у 2 рази, а від 24 до 168 год поглинання – більше, ніж у 5 разів, що вказує про енергозалежність накопичення селеніту проти градієнта концентрації.

Отже, результати дослідження показали, що найбільш ефективно накопичення хрому та селену в ліпідах мало місце на 7 добу при концентрації Cr(III) $5,0 \text{ мг/дм}^3$ разом із селеном ($10,0 \text{ мг/дм}^3$).

Вміст селену та хрому в окремих класах ліпідів у *Chlorella vulgaris* за дії натрію селеніту та хрому хлориду. Внесення в середовище культивування

хлорели натрію селеніту (10,0 мг Se(IV)/дм³) та хрому хлориду (5,0 мг Cr(III)/дм³) на 7 добу експерименту показало, що накопичення селену в ТАГ і фосфоліпідах зросло у 7,5 та 8,2 рази відповідно до контролю. Вміст селену у ТАГ збільшився в 1,9 рази, а в НЕЖК – в 1,1 рази. Щодо хрому, то його вміст у ТАГ і ФЛ зріс у 6,4 раза та 8,0 раз, а у ТАГ і НЕЖК – у 8,2 рази та 4,6 разів відповідно (табл. 1).

Таблиця 1.

Вміст селену та хрому в ліпідах різних класів у *Ch. vulgaris* за спільної дії натрію селеніту в концентрації 10,0 мг Se(IV)/дм³ та хрому хлориду в концентрації 5,0 мг Cr(III)/дм³, мкг/мг сухої маси ліпідів, $M \pm m$, n=5

Умови експерименту		Класи ліпідів			
		ТАГ	ДАГ	ФЛ	НЕЖК
Вміст Se(IV)	контроль	0,24±0,021	0,04±0,001	0,05±0,002	0,08±0,003
	дослід	0,45±0,044*	0,30±0,01*	0,41±0,031*	0,09±0,007
Вміст Cr(III)	контроль	0,11±0,004	0,05±0,002	0,04±0,001	0,09±0,005
	дослід	0,70±0,022*	0,41±0,017*	0,32±0,013	0,41±0,039

Примітка: $p < 0,05$ за t-критерієм Стьюдента (щодо контролю).

Найактивніше накопичення селену та хрому відбувається у ТАГ і ФЛ.

Вплив ліпідного та селенхромліпідного комплексів із хлорели на оксидативний статус у здорових щурів. За введення в культуральне середовище *Ch. vulgaris* натрію селеніту в концентрації 10,0 мг Se(IV)/дм³ у клітинах хлорели відбувається активація процесів біосинтезу ліпідів, клітини хлорели мають високий адаптивний енергетичний та антиоксидантний потенціал, а також при цьому здатні утворювати селенметалліпідні комплекси (Вінярська Г.Б., 2016). Тому ці закономірності були використані для отримання і перевірки біологічної активності зазначених комплексів на здорових щурах в експерименті.

Результати досліджень показали, що введення щурам в експерименті ліпідної та селенхромліпідної субстанцій із хлорели не викликали ендогенної інтоксикації в організмі тварин, оскільки за умов введення обох досліджуваних субстанцій відзначалось зниження вмісту молекул середньої маси у крові щурів від 7 до 60 %.

Встановлено, що вміст ТБК-АП та ДК зменшився у сироватці крові щурів при застосуванні ліпідного (відповідно на 23,5 % та 39,3 %) та селенхромліпідного (відповідно на 46,7 % та 54,4 %) комплексів порівняно з контролем, а у печінці обидва показники знизилися на 11,5 % і 19,8 % та 16 % і 23,6 % відповідно. Також виявлено, що після застосування обох досліджуваних субстанцій вірогідно зростає активність ГПО та ВГ. Встановлено, що після застосування комплексів у сироватці крові зростає активність каталази: за дії ліпідного екстракту – на 55,2 %, а селенхромліпідного комплексу – на 260,1 % щодо контролю. Проте, у печінці активність цього ензиму знижується. Зниження активності супероксиддисмутази відзначено при дії обох комплексів: у сироватці крові у 2–4 рази та у печінці щурів у 2–3 рази.

Отже, в антиоксидантному захисті ефективною в крові виявилася каталаза, проте її інгібування у печінці, а також супероксиддисмутази в обох досліджуваних тканинах, свідчить про можливу модифікацію їх активних центрів ліпідами хлорели за рахунок впливу селеніту та хрому.

Вплив ліпідного та селенхромліпідного комплексу із хлорели на енергетичний обмін у щурів. Важливим показником формування успішної адаптаційної стратегії є ефективність функціонування енергетичних систем в організмі.

Встановлено, що ліпідний екстракт та селенхромвмісний комплекс активували СДГ та ЦО. При цьому, якщо при введенні щурам ліпідного екстракту активність СДГ практично не зростала, а за споживання селенхромліпідного комплексу збільшувалася майже на 160 %, то активність ЦО зростала в обох випадках на 20 % та 15 % відповідно до показників у щурів контрольної групи.

НАДН-глутаматдегідрогеназна активність за дії ліпідного екстракту з хлорели достовірно знижувалася (на 32 %, $p \leq 0,01$), а за дії селенхромліпідного комплексу – зростала (на 410 %, $p \leq 0,001$). Активність НАДФН-ГДГ за введення щурам ліпідного екстракту з хлорели також суттєво зменшувалася – на 85 % ($p \leq 0,01$), а за введення щурам селенхромліпідного комплексу достовірно зростала на 48 % ($p \leq 0,01$) щодо контролю. Зростання показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ у всіх випадках свідчить про активізацію каталітичної ланки нітрогенового метаболізму.

Отже, результати досліджень засвідчили позитивний вплив ліпідного та селенхромліпідного комплексів з хлорели на метаболічні процеси у здорових щурів.

Вплив селенхромліпідного комплексу на вуглеводний та ліпідний обмін у щурів з експериментальним цукровим діабетом. Згідно результатів досліджень про вплив екстракту мікроводоростей (Cherng J.Y, 2006; Shibata S., 2003) селену (Никитина Л.П., Иванов В.М., 1995) і хрому (Morris B.W., 1999) на обмін речовин при цукровому діабеті, нами змодельована патологія у щурів та оцінено вплив селенхромліпідного комплексу порівняно з дією неорганічних сполук селену та хрому. Розвиток цукрового діабету 2-го типу підтверджували зростанням рівня глюкози в крові, наявністю глюкозурії та відсутністю кетонових тіл у сечі, ступенем толерантності до навантаження глюкозою, а також за рівнем фруктозаміну в сироватці крові. У щурів з експериментальним ЦД зростає вміст МСМ (рис. 3).

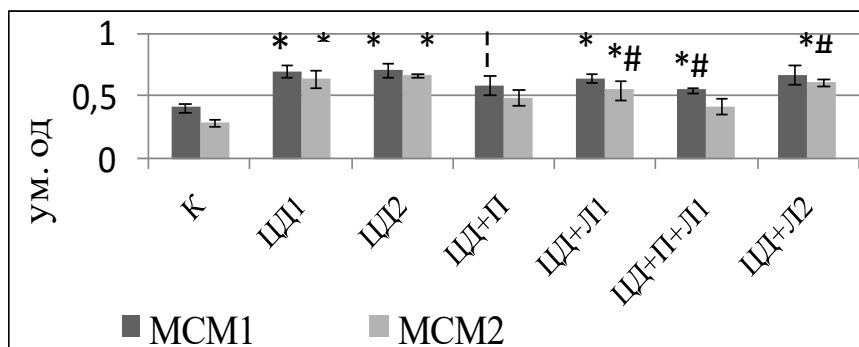


Рис. 3. Вміст молекул середньої маси сироватки крові щурів ($M \pm m$; $n=8-13$).

Примітка: тут і у наступних рисунках різниця показників достовірна ($p < 0,05$ за t-критерієм Стьюдента) щодо: * – контрольної групи (K), | – ЦД1; # – ЦД2.

При введенні селенхромліпідного комплексу відзначалося зниження показників загальної інтоксикації щодо показників ЦД у групах ЦД+Л1, ЦД+Л2, ЦД+П+Л1 вміст МСМ1 знижується відносно групи ЦД2 відповідно на 9,9 %, 5,6 % та 22,5 %, а вміст МСМ2 – зростає відповідно на 17,9 %, 9 % та 37,4 %.

Результати досліджень показали, що введення щурам в експерименті селенхромліпідної субстанції з хлорели знизило показники ендогенної інтоксикації

в організмі тварин. Було виявлено, що на 3 добу у тварин з експериментальним цукровим діабетом рівень глікемії зріс у 3,8 рази порівняно з показниками контрольних тварин та становив $(15,9 \pm 0,33)$ ммоль/дм³. З 14 доби рівень глюкози в крові знизився до $8,9 \pm 0,23$ ммоль/дм³ і до кінця спостереження майже не змінювався. Також у тварин з діабетом на 21 добу індукції ЦД спостерігалось істотне підвищення концентрації фруктозаміну в сироватці крові – в 1,9 рази (група ЦД1), а на 35 день – в 1,7 рази, що свідчить про активацію процесів неензимного глікозилювання, а також про посилення метаболізації глюкози гексозаміновим шляхом в інсуліночутливих тканинах (Загальні етичні..., 2003).

У здорових тварин глюкозурія не спостерігалася, після введення цитотоксину на 3–7 добу її концентрація становила до 0,5 %, далі – 0,1 %. Після 7 доби кетонівих тіл в сечі не виявлено. Отримані результати свідчать про відсутність кетоацидозу.

Проведений глюкозотолерантний тест показав, що у тварин з ЦД рівень глікемії через 2 години від моменту введення глюкози залишався вищим ніж 13 ммоль/дм³, що свідчить про порушення толерантності до глюкози у щурів.

При введенні тваринам селенхромліпідного комплексу у групі щурів ЦД+П відзначається зниження рівня глюкози в крові на 3,5 %, фруктозаміну – на 9,6 % порівняно з групою ЦД1 (рис. 4).

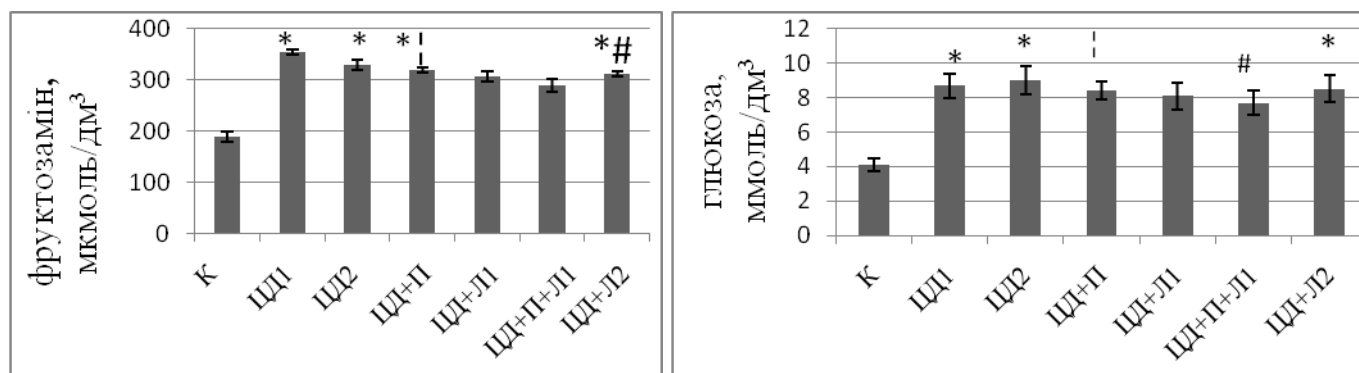


Рис. 4. Вміст фруктозаміну та рівень глікемії щурів ($M \pm m$, $n = 8-12$).

У щурів груп ЦД+Л1, ЦД+Л2 та ЦД+П+Л1 рівень глікемії відносно групи ЦД2 знизився відповідно на 10 %, 5,6 % та 14,5 %, а фруктозаміну – відповідно на 6,7 %, 5,5 % та 12,2 %.

При розвитку ЦД порушення обміну вуглеводів поєднуються з вираженими змінами у ліпідному обміні: збільшився вміст ЛПНЩ та холестеролу (рис. 5).

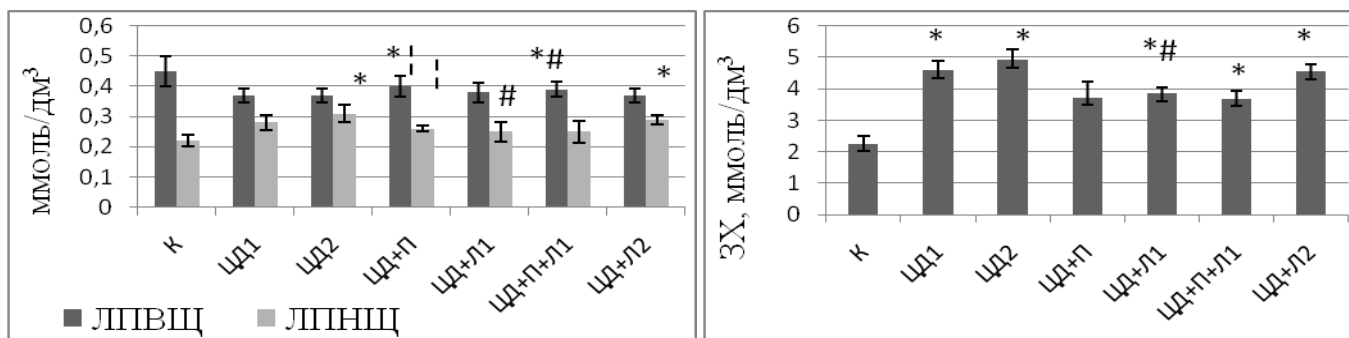


Рис. 5. Вміст холестеролу загального та у складі ліпопротеїнів сироватки крові щурів ($M \pm m$; $n = 8-9$).

Вміст ЛПВЩ зріс у групі ЦД+П на 8,1 % відносно групи ЦД1, а у групах ЦД+Л1 та ЦД+П+Л1 відносно групи ЦД2 відповідно на 2,7 %, 5,4 %; показники ЛПВЩ у групі ЦД+Л2 не змінилися.

Вміст продуктів ПОЛ та активність ензимів антиоксидантного захисту у печінці та крові щурів з моделлю цукрового діабету 2-го типу на фоні введення селенхромліпідного комплексу. Оскільки вплив на стан системи антиоксидантного захисту за умов ЦД є важливим напрямком у розробці терапевтичних засобів корекції діабетичних ускладнень, важливим етапом досліджень був аналіз впливу селенхромліпідного комплексу з *Ch. vulgaris* на прооксидантно-антиоксидантний статус печінки та сироватки крові щурів з моделлю ЦД 2-го типу.

Результати показали, що за умов експерименту у дослідних тварин достовірно зросли показники оксидативного стресу (табл. 2).

Таблиця 2.

Вміст АФК, дієнових кон'югатів та ТБК-активних продуктів у сироватці крові та печінці щурів при застосуванні селенхромліпідного комплексу та введення неорганічних сполук Cr(III) та Se(IV) ($M \pm m$; $n=8-13$)

Показники		Групи тварин						
		К	ЦД1	ЦД2	ЦД+П	ЦД+Л1	ЦД+П+Л1	ЦД+Л2
Сироватка крові	ТБК-АП, мкмоль/дм ³	48,0± 4,49	92,4± 7,92*	96,62± 6,08*	84,71± 5,51*	79,5± 3,07*	77,16± 8,11#	81,23± 6,11
	ДК, ум. од/мл	6,51± 0,38	13,14± 1,38*	14,5± 1,04*	8,67± 0,89	11,55± 1,52#	10,83± 1,37	12,91± 1,19*#
	АФК, %	31,0± 3,01	51,99± 3,95*	55,12± 2,63*	36,87± 2,31 _↓	37,02± 2,59#	35,1± 2,77#	49,01± 4,11*
Печінка	ТБК-АП, мкмоль/кг	60,0± 6,15	112,51± 7,68	115,49± 8,54*	98,31± 6,37* _↓	102,9± 6,61*#	89,16± 4,61#	106,62± 6,62*
	ДК, ум. од/г	1,26± 0,10	1,81± 0,19	2,02± 0,09*	1,69± 0,13	1,73± 0,07#	1,67± 0,15	1,71± 0,08*#

Примітка: тут і в наступних таблицях різниця показників достовірна ($p < 0,05$ за t -критерієм Ст'юдента) відносно: * – контрольної групи (К), _↓ – ЦД1; # – ЦД2.

За умов введення селенхромліпідного комплексу з профілактичною та лікувальною метою на фоні ЦД виявлено, що кількість АФК є лише на 20 % більшою, ніж у здорових щурів, а використання комплексу впродовж 35 діб (ЦД+П+Л1) сприяло зниженню АФК на 13 %. Поряд з тим, використання хрому і селену у вигляді неорганічних сполук спричиняло менший ефект.

При введенні селенхромліпідного комплексу стабілізувався та покращився стан АОС тварин. Щодо активності каталази, то у сироватці крові у щурів з ЦД її значення було на 25–28 % меншим, ніж у тварин контрольної групи. За умов введення селенхромліпідної субстанції щурам груп ЦД+Л1, ЦД+П та ЦД+П+Л1 активність каталази у сироватці крові була практично в межах контрольних показників, а у печінці була на 12–16 % вищою, ніж у тварин контрольної групи.

За результатами дослідження активність СОД зменшилася у щурів з ЦД. При введенні субстанції з лікувальною метою активність СОД зросла у сироватці крові на 22 %, у печінці на 11 %, а з лікувально-профілактичною метою – відповідно на

13 % та на 20 % порівняно з хворими тваринами. За введення неорганічної суміші селену та хрому активність ензиму збільшилася на 34 % у сироватці крові та на 11 % у печінці щодо щурів з ЦД (табл. 3).

Таблиця 3.

Показники АОС у крові та печінці щурів при застосуванні селенхромліпідного комплексу та введення неорганічних форм Cr(III) та Se(IV) (M±m; n=8–13)

Показники		Групи тварин						
		К	ЦД1	ЦД2	ЦД+П	ЦД+Л1	ЦД+П+Л1	ЦД+Л2
Сироватка крові	Каталаза, мкат/дм ³	4,11± 0,23	3,08± 0,32*	2,96± 0,15*	4,12± 0,21	4,04± 0,09	4,09± 0,54	4,01± 0,09#
	СОД, ум. од/мл	0,44± 0,04	0,22± 0,02*	0,24± 0,03*	0,19± 0,02* _↓	0,28± 0,03*#	0,26± 0,02*#	0,31± 0,03
	ГПО, ммоль/ хв.×дм ³	0,13± 0,01	0,15± 0,01	0,14± 0,01	0,19± 0,02*	0,17± 0,01	0,21± 0,02*	0,2± 0,02
	ВГ, мкмоль/мл	4,9± 0,66	4,04± 0,52	3,09± 0,40*	3,29± 0,36*	3,19± 0,41	3,33± 0,39	3,11± 0,25*#
Печінка	Каталаза, мкат/кг	2,57± 0,08	3,05± 0,07*	2,72± 0,08	2,88± 0,06* _↓	2,43± 0,11	2,89± 0,04*#	2,99± 0,11*#
	СОД, ум. од/мг	0,73± 0,05	0,58± 0,04	0,51± 0,05*	0,61± 0,03 _↓	0,59± 0,03*#	0,65± 0,07	0,6± 0,06
	ГПО, ммоль/ хв.×кг	0,04± 0,003	0,05± 0,004	0,05± 0,003	0,08± 0,008*	0,04± 0,004*	0,09± 0,011*	0,04± 0,004#
	ВГ, мкмоль/г	202,5± 15,88	131,2± 16,75*	121± 11,15*	161,7± 15,82 _↓	149,9± 19,18	158,8± 19,84#	134,5± 18,43*

Отримані результати показали, що у щурів з цукровим діабетом активність глутатіонпероксидази залишалася в межах контрольних показників. Введення селенхромліпідної субстанції з профілактичною та лікувально-профілактичною метою вказує на суттєве збільшення активності ГПО щодо щурів з ЦД: у тварин групи ЦД+П – на 31 % у сироватці крові та на 70 % у печінці, у щурів групи ЦД+П+Л1 на 45 % та на 90 % відповідно. При введенні неорганічних хрому та селену зміни відмічаються лише в крові – активність пероксидази збільшилася на 38 % щодо контролю. Використання селенхромліпідного комплексу в лікувальних цілях (ЦД+Л1) показало найменший ефект.

В експерименті відзначено зниження вмісту ВГ у щурів з ЦД. При введенні селенхромліпідної субстанції за всіх умов досліду спостерігається деяке підвищення вмісту ВГ у сироватці крові (в межах до 10 %) порівняно з хворими тваринами. Так, при ЦД+Л1 вміст ВГ у печінці щурів був на 19 % більшим, ніж при ЦД, при ЦД+П та ЦД+Л+П – відповідно більшим на 28 % і на 26 %, при ЦД+Л2 – лише на 7 %.

Покращення метаболічних процесів за умов введення щурам з ЦД селенхромліпідного комплексу у різних варіантах, ймовірно, пояснюється як безпосередньою роллю селену, який включається до складу ГПО, тим самим підвищуючи її активність, так і опосередкованим впливом хрому.

Вплив селенхромліпідної субстанції із *Chlorella vulgaris* на енергетичний метаболізм у щурів за експериментального цукрового діабету. У дослідженні

також визначено активність ключового ензиму циклу трикарбонних кислот – сукцинатдегідрогенази, та електронно-транспортного ланцюга – цитохромоксидази, а також глутаматдегідрогеназну активність.

В процесі дослідження з'ясовано, що у групі тварин ЦД1 активності ЦО та СДГ у печінці знизилися відповідно на 20 % і 10,5 % щодо контролю (рис. 6).

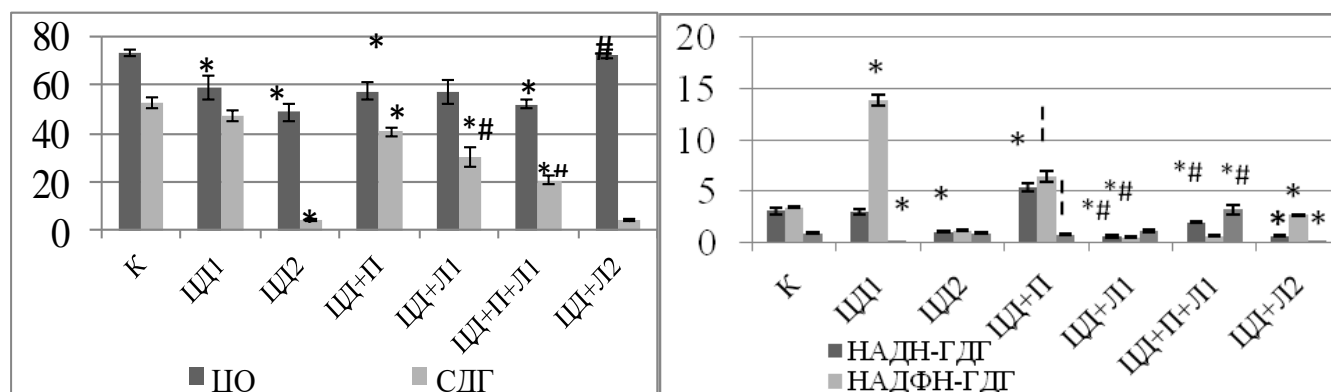


Рис. 6. Вплив селенхромліпідного комплексу на показники енергетичного обміну у печінці щурів ($M \pm m$, $n = 8-13$).

За введення селенхромліпідної субстанції спостерігається підвищення активності СДГ, зокрема у групі ЦД+Л1 її активність зросла у 7,5 раза порівняно з групою ЦД2, у групі ЦД+Л2 – збільшення відбулося лише на 3 %, а у групі ЦД+П+Л1 – в 5,2 раза. Підвищення сукцинатдегідрогеназної активності узгоджується з підвищенням активності цитохромоксидази: у групі ЦД+Л1 відзначається покращення активності ЦО на 17,2 %, у групі ЦД+Л2 – на 49,1 % та на 7 % у групі ЦД+П+Л1. Активність СДГ і ЦО у щурів, яким вводили селенхромліпідний комплекс з профілактичною метою, знизилася незначно.

При ЦД 2-го типу з ожирінням внутрішньоклітинний рівень НАДФН, як правило, підвищується, що призводить до збільшення продукції супероксид-радикалів, посилення оксидативного стресу і появи деструктивних процесів у тканинах. У досліді активність НАДФН-ГДГ у щурів з діабетом зросла в 4,0 рази порівняно з контролем, НАДН-ГДГ практично не змінилася, а співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ зменшилося в 4,1 рази.

НАДН-глутаматдегідрогеназна активність за дії селенхромліпідного комплексу достовірно зростала на 80,6 % у групі ЦД+П порівняно з групою ЦД1, у групі ЦД+Л1 та ЦД+Л2 активність НАДН-ГДГ знизилася на 43 % і 39,8 % відповідно, а у групі ЦД+П+Л1 – зросла на 90,3 % щодо показника групи ЦД2.

Активність НАДФН-ГДГ за умов введення щурам селенхромліпідного комплексу також суттєво зменшувалася у групі ЦД+П – в 2,1 рази відносно групи ЦД1, а за споживання щурами селенхромліпідного комплексу груп ЦД+Л1 та ЦД+П+Л1 достовірно знизилася в 2,3 та 1,9 рази, лише за введення неорганічних форм Cr(III) та Se(IV) показник зріс в 1,9 рази щодо показника у тварин групи ЦД2.

В експерименті мало місце зростання показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ в усіх групах тварин, яким вводили селенхромліпідний комплекс, більшою мірою у групі ЦД+П – в 3,7 рази (щодо групи ЦД1) та у групі ЦД+П+Л1 – в 3,5 рази відносно групи ЦД2. Зростання показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ свідчить про активізацію каталітичної ланки нітрогенового метаболізму в організмі тварин. Суттєве зниження даного показника відзначалося у

групі щурів, яким вводили неорганічні форми Cr(III) та Se(IV) відносно групи ЦД2, а у групі ЦД+Л1 – показник зріс в 1,2 рази.

Загалом, виявлені зміни основних показників вуглеводного, ліпідного обмінів та оксидативного статусу відповідають клінічній картині, що супроводжує розвиток цукрового діабету. Введення селенхромліпідного комплексу з хлорели з лікувальною та профілактичною метою при розвитку ЦД сприяє нормалізації обміну речовин та зниженню інтоксикаційного фону.

З результатів досліджень можна стверджувати, що використання селенхромліпідного комплексу, виділеного з хлорели, володіє набагато більшим терапевтичним ефектом при змодельованому ЦД і є ефективнішим порівняно з неорганічними сполуками. Отримані результати відкривають перспективу використання БАД з хлорели із вмістом йонів хрому(III) та селену(IV) для зменшення розвитку патологічних процесів при діабеті 2-го типу.

ВИСНОВКИ

Досліджено можливість утворення селенхромліпідного комплексу хлорелою, що володіє корегуючими властивостями за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету та сприяє нормалізації низки показників обміну речовин та зниженню інтоксикаційного фону за цієї патології.

1. За інкубації *Ch. vulgaris* водоростей упродовж 7 діб за дії селеніту (10 мг Se(IV)/дм³) спільно з Cr(III) (5,0 мг/дм³) вміст селену зростає у 3,46 рази, а хрому – у 5,01 рази щодо показників у контролі. У *Chlorella vulgaris* за досліджуваних умов культивування загальний вміст ліпідів зростає на 9,91 %; вміст три-, диацилгліцеролів і фосфоліпідів збільшується на 20,5 %, 4,4 % та 17,6 % відповідно, а вміст неетерифікованих жирних кислот знижується на 24 % порівняно з контролем. Найбільше накопичення селену та хрому у їх комплексі відбувається у диацилгліцеролах і фосфоліпідах.

2. Накопичення хрому клітинами *Ch. vulgaris* є концентраційно- і часозалежним процесом, носить флуктуаційний характер для всіх досліджених концентрацій хрому. Так, 1-й етап – адаптація клітин до нового чинника – пов'язаний з мембранними механізмами формування стрес-реакції клітин; 2-й – активне накопичення йонів хрому, який закінчується з насиченням центрів зв'язування йонів металів; 3-й етап – пригнічення контрольованої фіксації хрому у клітині в цілому та ліпідах зокрема (6-12 год); 4-й етап – відновлення накопичення (12–168 год), що є хаотичним і неконтрольованим клітиною та супроводжується її загибеллю (168–240 год).

3. Накопичення селену підлягає закономірності Міхаеліс-Ментен упродовж усього часу експозиції; виявлені зменшення значення V_{\max} та збільшення значення K свідчать про зменшення спорідненості до селеніту компонентів йон-транспортної системи, що позначається на значенні $E_{\text{акт.}}$ процесу, що збільшується від 24 до 72 год у 2 рази, а від 24 до 168 год поглинання – більше, ніж у 5 разів.

4. Отримано ліпідний та хромселенліпідний комплекси з хлорели, сталість складу та структури якого підтверджено хроматографічно та мас-спектрометричним аналізом. При згодовуванні крохмального розчину селенхромліпідного комплексу, 1 мл якого містив 1,85 мкг селену, 1,1 мкг хрому, 0,5 мг ліпідів, здоровим щурам інтоксикації не виявлено (загальний вміст молекул середньої маси знижувався майже у 1,5 рази), у печінці підвищувалися активності сукцинатдегідрогенази і

цитохромоксидази, активувалися НАДН- та НАДФН-глутаматдегідрогенази та змінювалося їх співвідношення у 3 рази. Як у печінці, так і в сироватці крові здорових щурів знижувалися вміст ТБК-активних продуктів та дієнових кон'югатів, зростала активність каталази та вміст відновленого глутатіону. В організмі щурів активізувалися антиоксидантні процеси за рахунок зростання вмісту відновленого глутатіону та активності супероксиддисмутази при зниженні функціональної ролі каталази.

5. За експериментального цукрового діабету введення селенхромліпідного комплексу упродовж 14 діб призвело до: зниження показників загальної інтоксикації (зниження вмісту MCM_1 на 15,7 % та підвищення вмісту MCM_2 на 23,5 %); покращення стану вуглеводного обміну (зниження рівня глюкози в крові на 3,5 %, фруктозаміну – на 9,6 % відносно групи щурів з цукровим діабетом); покращення ліпідного обміну (зниження вмісту загального холестеролу та ліпопротеїнів низької щільності – на 18,6 % та 7,1 %, відносно групи ЦД). Показники оксидативного статусу організму щурів порівняно з даними при ЦД покращилися: зменшилися вміст ТБК-активних продуктів на 20 % у крові та на 23 % у печінці, дієнових кон'югатів на 24 % у крові і на 17 % у печінці, активних форм кисню – на 36 %; у крові та у печінці підвищилися активність каталази (відповідно на 31% і на 38%), супероксиддисмутази (відповідно на 27 % і 30 %), глутатіонпероксидази (відповідно на 13 % і 83 %).

6. Виявлені зміни основних показників вуглеводного і ліпідного обмінів та оксидативного статусу відповідають клінічній картині, що супроводжує розвиток цукрового діабету і узгоджуються з метаболічними порушеннями у людей, хворих на інсуліннезалежний цукровий діабет. Введення селенхромліпідного комплексу з хлорели з лікувальною та профілактичною метою в процесі розвитку стрептозотоцинового цукрового діабету сприяє нормалізації обміну речовин та зниженню інтоксикаційного фону, який супроводжує цю патологію.

7. Використання селенхромліпідного комплексу, виділеного з хлорели, дає кращий терапевтичний ефект при змодельованому цукровому діабеті і є ефективнішим порівняно з неорганічними сполуками хрому та селену. Отримані результати відкривають перспективу використання біологічно активних добавок із хлорели з Cr(III) та Se(IV) для корекції патологічних процесів за розвитку діабету 2-го типу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Боднар, О. І.; Лукашів, О. Я.; Вінярська, Г. Б.; Грубінко, В. В. Оксидативний статус щурів за експериментального діабету 2-го типу та його корекція селенхромліпідною субстанцією із *Chlorella vulgaris* Beij. *Медична та клінічна хімія*. **2017**, 19 (3), с 71 – 81 (Здійснення аналізу літературних джерел, участь у проведенні досліджень та написанні статті).

2. Лукашів, О. Я.; Боднар, О. І.; Грубінко, В. В. Корекція обміну речовин у щурів селенхромліпідним комплексом з *Chlorella vulgaris* Beij та сполуками хрому(III) і селену(IV) за експериментального цукрового діабету 2-го типу. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка. Сер. Біологія. **2017**, 4 (71), с 55 – 61. (Аналіз літературних джерел, участь у проведенні досліджень, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

3. Лукашів, О. Я.; Грубінко, В. В. Вплив селенхромліпідної субстанції із *Chlorella vulgaris* Beij. на енергетичний метаболізм у щурів за експериментального цукрового діабету. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина.* **2017**, 8(3), с 369 – 376. (Аналіз літературних джерел, участь у проведенні досліджень та написанні статті).

4. Lukashiv, O.; Shmanko, V.; Grubinko, V. Effect of selenium-chrome-lipid complex with *Chlorella vulgaris* Beij. on the carbohydrate and lipid metabolism in experimental type 2 diabetes. *Norwegian Journal of development of the International Science.* **2017**, 11, pp 41 – 47. (Здійснення аналізу літературних джерел, проведення експериментальних та участь у здійсненні лабораторних досліджень, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

5. Lukashiv, O. Ya.; Vodnar, O. I.; Vinyarska, G. B.; Grubinko, V. V. Accumulation of Chromium and Selenium Inside Cells and in Lipids of *Chlorella vulgaris* Beij. During the Incubation from Chromium by Sodium Chloride and Selenium. *International Journal on Algae.* **2017**, 19 (4), p. 357 – 366. (Аналіз літературних джерел, проведення експериментальних та участь у здійсненні лабораторних досліджень, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

6. Лукашів, О. Я.; Боднар, О. І.; Вінярська, Г. Б.; Грубінко В. В. Вплив селенхромліпідної субстанції із *Chlorella vulgaris* Beij. на оксидативний статус щурів. *Медична та клінічна хімія.* **2016**, 18 (2), с 28 – 34. (Аналіз літературних джерел, участь у проведенні досліджень, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

7. Лукашів, О. Я.; Боднар, О. І.; Грубінко, В. В. Вплив на метаболічні процеси в організмі селеновмісних біодобавок та перспективи їх використання. *Вісник проблем біології та медицини.* **2016**, 2 (3), с 30 – 34. (Аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

8. Lukashiv, O.; Vodnar, O.; Vasilenko, O.; Grubinko, V. The effect of selenium-chrome-lipid substance from *Chlorella vulgaris* Beij. on energy metabolism in rats. *WorldScience.* **2016**, 11 (7), pp. 17 – 21. (Аналіз літературних джерел, участь у проведенні досліджень, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

9. Grubinko, V.; Lutsiv, A.; Vodnar, O.; Viniarska H.; Lukashiv, O. Directed biosynthesis of biologically active lipids from algae. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* **2016**, 73, с 436 – 436. (Проведення аналізу літератури, участь у постановці експерименту та написанні статті).

10. Лукашів, О. Я.; Грубінко, В. В. Селеновмісні біодобавки: проблеми та перспективи використання. *Хімія природних сполук*, Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, Тернопіль, Україна, Квітень 21 – 22, 2016; ТДМУ, 2016; с 34 – 36.

11. Лукашів, О. Я.; Боднар, О. І.; Вінярська, Г. Б.; Грубінко, В. В. Отримання та профілактична дія селенхромліпідного препарату із хлорели за стрептозотоцин-нікотинамід-індукованого діабету на тлі ожиріння. *Актуальні питання медицини і біології*, Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Полтава, Україна, Травень – червень 30 – 1, 2017; Аструя, 2016; с 25 – 27.

12. Грубінко, В. В.; Боднар, О. И.; Винярская, Г. Б.; Лукашив, О. Я. Получение биологически активного селен-цинк-липидного препарата из *Chlorella vulgaris* Beij. (chlorophyta) и его антиоксидантные свойства. *Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине*,

Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР, Москва, Россия, Июнь 23 – 25, 2016; Щербинская типография, 2016; с 583 – 587.

13. Лукашів, О. Я.; Вінярська, Г. Б. Отримання та біологічна активність селенметаллідних препаратів із *Chlorella vulgaris* Beij. *Biotechnology for agri culture and environmental protection*, XII International scientific -applied conference, Odessa, Ukraine, September 07 – 10, 2016; I. I. Mechnikov Odessa National University, 2016; с 140 – 142.

14. Лукашів, О. Я.; Грубінко, В. В.; Боднар, О. І.; Луців, А. І.; Вінярська, Г. Б. Біотехнологія спрямованого біосинтезу біопалива та біологічно активних речовин у мікроводоростей. *Стан природних ресурсів, перспективи їх збереження та відновлення*, Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції, Дрогобич, Україна, Жовтень 12 – 14, 2016; Редакційно-видавничий відділ ДДПУ імені Івана Франка, 2016; с 24 – 26.

15. Лукашів, О. Я.; Боднар, О. И.; Винярская, Г. Б.; Грубинко, В. В. Влияние селенита натрия и хлорида хрома (III) на содержание липидов у *Chlorella vulgaris* Beij. в аквакультуре. *Перспективы и проблемы современной гидробиологии*, Материалы Всероссийской молодежной гидробиологической конференции, Борок, Россия, Ноябрь 10 – 13 2016; Филигрань, 2016; с 175 – 177.

16. Боднар, О. И.; Винярская, Г. Б.; Лукашів, О. Я.; Грубинко, В. В. Регуляция биосинтеза липидов у микроводорослей (на примере *Chlorella vulgaris* Beij.) ионами металлов. *Битехнология: состояние и перспективы развития*, Материалы IX Международного конгресса, Москва, Россия, Февраль 20 – 22 2017; с 498 – 501.

17. Лукашів, О. Я. Метаболічні процеси у щурів при експериментальному діабеті 2 типу за дії неорганічних та органічних сполук селену і хрому. Матеріали I Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції, Бердянськ, Україна, Квітень 3 – 8 2017; Видавництво БДПУ, 2017; с 194 – 196.

18. Боднар, О. И.; Винярская, Г. Б.; Лукашів, О. Я.; Грубинко, В. В. Выделение и биологическая активность металл-селен-липидного комплекса из *Chlorella vulgaris*. *Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века*, Материалы 17-й международной научной конференции, Минск, Беларусь, Май 18 – 19 2017; ИВЦ Минфина, 2017; с 112.

19. Грубінко, В. В.; Курант, В. З.; Хоменчук, В. О.; Боднар, О. І.; Вінярська, Г. Б.; Лукашів, О. Я. Роль ліпідів клітинних мембран у формування стійкості до дії іонів цинку еритроцитів риб і клітин хлорели. *Проблеми функціонування та підвищення біопродуктивності водних екосистем*, Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, присвячені 100-річчю Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна, Вересень, 12 – 15 2017; Дніпро: ПЦ «Формат», 2017; с 52 – 55.

20. Khomenchuk, V.; Kurant, V.; Bodnar, O.; Viniarska, H.; Lukashiv, O.; Grubinko, V. The Role of Lipids in Cell Membrane the Formation of Resistance to Zinc Ions in Erythrocytes of Fish and Cells of *Chlorella*. *Natural Resources of Border Areas under a Changing Climate*, Material of the International scientific conference, Chernihiv, Ukraine, September 27 – 29 2017; Chernihiv: Desna Polygraph, 2017; pp 11 – 12.

21. Bodnar, O.; Viniarska, H.; Lukashiv, O.; Kantycka, O.; Onufrijchuk, L.; Halyniak, O.; Grubinko, V. Correction of oxidative processes by selenium – chromium – lipid substance with *Chlorella vulgaris* in rats with experimental diabetes. Material of the

7th International Weigl conference, Lviv, Ukraine, September 26 – 29, 2017; I. Franko Lviv National University, 2017; p 184.

АНОТАЦІЯ

Лукашів О. Я. Отримання та дослідження біологічної активності селенхромліпідних комплексів з *Chlorella vulgaris* Beij. за дії на організм щурів стрептозотоцину – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» МОЗ України, Тернопіль, 2017.

У дисертації вперше встановлено здатність та оптимальні умови вирощування і включення селену та хрому у *Chlorella vulgaris* за спільного культивування з натрію селенітом в концентрації 10,0 мг Se(IV)/дм³ та хрому хлоридом в концентрації 5,0 мг Cr(III)/дм³ зі зростанням вмісту селену у 3,5 раза, а хрому – у 5,0 раз щодо контролю.

Знайшли розвиток уявлення про концентраційно- і часозалежний етапний механізм накопичення селену та хрому у клітини водоростей.

Виділено ліпідний та селенхромліпідний комплекси, що містив Se(IV) і Cr(III) та за умов щодобового введення на протязі 14 діб в організмі тварин не виявляв інтоксикації, активував енергетичний метаболізм та проявляв високу антиоксидантну активність. Вперше встановлено за експериментального цукрового діабету 2-го типу на тлі ожиріння, викликаного висококалорійною дієтою з глутаматом натрію та одноразовим введенням стрептозотоцину з нікотинамідом, згодовування селенхромліпідного комплексу знижує показники загальної інтоксикації, рівень глюкози та фруктозаміну в крові, покращує ліпідний обмін та стабілізує оксидативний статус у тканинах.

Встановлено, що використання селенхромліпідного комплексу, виділеного з хлорели, надає набагато більший терапевтичний ефект при змодельованому цукровому діабеті, і є ефективнішим порівняно з неорганічними сполуками, засвоєння яких в організмі є набагато нижчим. Отримані результати відкривають перспективу використання біологічно активних добавок з хлорели із вмістом хрому та селену для корекції патологічних процесів за розвитку діабету 2-го типу.

Ключові слова: *Chlorella vulgaris*, цукровий діабет, стрептозотозин, селенхромліпідні комплекси, метаболізм, біологічно активні добавки, щури.

АННОТАЦИЯ

Лукашів О. Я. Получение и исследование биологической активности селенхромлипидных комплексов с *Chlorella vulgaris* Beij. при действии на организм крыс стрептозотоцина – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского» МОЗ Украины, Тернополь, 2017.

В диссертации впервые установлены способности и оптимальные условия выращивания и включение селена и хрома в *Chlorella vulgaris* при совместном культивировании с натрия селенитом в концентрации 10,0 мг Se(IV)/дм³ и хрома

хлоридом в концентрации 5,0 мг Cr(III)/дм³) с увеличением содержания селена у 3,5 раза, а хрома – у 5,0 раз относительно контроля.

Получили развитие представления о концентрационной и временной зависимости протекания этапного механизма накопления селена и хрома в клетки водорослей.

Выделены липидный и селенхромлипидный комплексы, которые при ежедневном введении в организме животных не вызывали интоксикации, активировали энергетический метаболизм и проявляли высокую антиоксидатную активность. Впервые установлено, что при экспериментальном сахарном диабете 2-го типа на фоне ожирения, вызванного высококалорийной диетой и одноразовым введением стрептозотоцина и никотинамида, введение селенхромлипидного комплекса снижает показатели общей интоксикации, уровень глюкозы и фруктозамина в крови, улучшает липидный обмен и стабилизирует оксидативный статус в тканях.

Установлено, что использование селенхромлипидного комплекса, выделенного из хлореллы, оказывает гораздо высший терапевтический эффект при смоделированном сахарном диабете, и является эффективным по сравнению с неорганическими соединениями, усвоение которых в организме намного ниже. Полученные результаты открывают перспективу использования биологически активных добавок из хлореллы с содержанием хрома и селена для коррекции патологических процессов при развитии сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, сахарный диабет, стрептозотоцин, селенхромлипидные комплексы, метаболизм, биологически активные добавки, крысы.

SUMMARY

Lukashiv O. Ya. Receiving seleniumchromelipid complexes from *Chlorella vulgaris* Beij. after the influence of streptozotocin on rats and investigation of the biological activity of these complexes – Manuscript.

Thesis for the degree of a candidate of biological sciences in the speciality 03.00.04 - biochemistry. – «I. Horbachevsky Ternopil State Medical University» Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2017.

For the first time in this dissertation were established abilities and optimal conditions for the cultivation and inclusion of selenium and chromium into *Chlorella vulgaris* after coculturing with sodium selenite at a concentration of 10.0 mg of Se(IV)/дм³ and chromium chloride at a concentration of 5.0 mg Cr(III)/дм³) In the course of the study, it was found that selenium content increased by 3.5 times, and chromium content became by 5,0 times higher than control, as well as lipid accumulation, which most often included selenium and chromium in DAG and PL.

Biomass of living cells was taken on the 7th day of cultivation.

New ideas features appeared about the concept of a concentration and time-dependent interim mechanism of selenium and chromium accumulation in algae cells in the experimental conditions in which an aqueous solution of sodium selenite (Na₂SeO₃) was added to the algae culture and was calculated based on the amount of Se(IV) ions - 10.0 mg/дм³ and an aqueous solution of CrCl₃·6H₂O based on Cr(III) content – 0.5; 1; 2; 5; 7.5 mg/дм³. To study the kinetic parameters of chromium accumulation in the algae cells and lipids, the biomass was taken at 1, 3, 6, 12, 24, 72, 168, 240 hours.

The received results have shown that absorption of chromium by *Ch. vulgaris* has well expressed concentration and time dependence, which is directly proportional to the amount of brought into the environment of indicated microelement, carries fluctuating character, and it is determined that the use of chromium concentration of 5.0 mg/dm³ will be optimal for further researches and prospects of isolation of chrome-lipid substance from chlorella biomass in the presence of sodium selenite (10.0 mg/dm³) for 7 days incubation.

A stable lipid and seleniumchromelipid complex that contained selenium and chromium was isolated and it showed high biological activity. After it was daily administered (for 14 days at a dose of 1.85 µg of selenium, 1.1 µg of chromium and 0.5 mg of lipids per 1 ml of 1 % water-starch suspension) to rats, it did not let to any intoxication, in the liver of healthy rats it activated the energy metabolism and showed high antioxidant activity.

The biological action of the seleniumchromelipid complex on the metabolism of rats with experimental diabetes mellitus was tested for the first time. The first step was to model the alimentary obesity after the 4-week high-calorie diet, which included: standard food (47 %), sweet concentrated milk (44 %), corn oil (8 %), vegetable starch (1 %), with the addition of glutamate sodium in the ratio of 0.6:100.0, and the next step was to reproduce the streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes II model after a single intraperitoneal administration of streptozotocin in a dose of 65 mg/kg with previous intraperitoneal administration of nicotinamide in a dose of 230 mg/kg.

For diabetes, in the context of the activation of oxidative stress in the body, there are significant changes in the molecular organization of mitochondrial membranes, which lead to a disruption of the functioning of the respiratory chain enzymes and, consequently, of bioenergetic processes in the cells. The insertion of the selenchromelipid complex brakes the development of metabolic disorders and improves metabolic processes in rats in the experiment. In the research process, it was found that in animals at the 21st day of development of diabetes, the activity of CO and EDD in the liver decreased, compared with the control group. In the research in diabetic rats, NADPH-GDH activity increased in 4 times compared to control, NADN-GDG has decreased and correlation of NADH-GDG/NADPH-GDG has decreased.

It was discovered that in animals with obesity and experimental diabetes mellitus II, the steady development of which was confirmed by hyperglycemia and metabolic intoxication, the administration of seleniumchromelipid complex reduces the rates of general intoxication, glucose and fructosamine levels in the blood, improves lipid and energy metabolism and stabilizes the oxidative status in the tissues.

It was found that usage of the seleniumchromelipid complex that was previously isolated from chlorella has a greater therapeutic effect in the modeled diabetes and is more effective than inorganic compounds. The absorption rate of inorganic compounds in the organism is much lower. The obtained results open the perspective of using biologically active additives that were isolated from chlorella and contain chromium and selenium for the correction of pathological processes in clients with type 2 diabetes.

Key words: *Chlorella vulgaris*, *diabetes mellitus*, *streptozotocin*, *seleniumchromelipid complexes*, *metabolism*, *biologically active additives*, *rats*.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система
АФК – активні форми кисню
БАД – біологічно активні добавки
БАР – біологічно активні речовини
ВГ – відновлений глутатіон
ГПО – глутатіонпероксидаза
ДАГ – диацилгліцероли
E_{акт.} – енергія активації
ЗХ – загальний холестерол
K – константа зв'язування
КТ – каталаза
ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності
ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності
МСМ – молекули середньої маси
НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
НЕЖК – неетерифіковані жирні кислоти
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
СДГ – сукцинатдегідрогеназа
СОД – супероксиддисмутаза
ТАГ – триацилгліцероли
ТБК-АП – активні продукти тіобарбітурової кислоти
ФЛ – фосфоліпіди
ЦД – цукровий діабет
ЦО – цитохромоксидаза
V_{max} – швидкість реакції

Підписано до друку 25.12.2017 р.
Формат 60x84/16.
Папір друк. Друк офсетний.
Ум. друк. арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам. № 12/17/1-5

Віддруковано у видавничому центрі "Вектор"
46018, м. Тернопіль, вул. Львівська, 12,
Тел. 8 (0352) 40-08-12

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції
серія ТР № 46 від 07 березня 2013р.
ФОП Осадца Ю.В.