

# ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

УДК 616.379-008.64:615.099.036.2-611.36-08

DOI 10.32782/2226-2008-2022-3-1

*О. П. Мялюк<sup>1</sup>, М. І. Марущак<sup>2</sup>, О. М. Копаниця<sup>1</sup>, Н. В. Сачук<sup>1</sup>, Н. В. Ліснянська<sup>3</sup>*

## РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КАРАГІНАНУ

<sup>1</sup>КЗВО «Рівненська медична академія» Рівненської обласної ради, Рівне, Україна

<sup>2</sup>Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна

<sup>3</sup>ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України», Чернівці, Україна

УДК 616.379-008.64:615.099.036.2-611.36-08

*О. П. Мялюк<sup>1</sup>, М. І. Марущак<sup>2</sup>, О. М. Копаниця<sup>1</sup>, Н. В. Сачук<sup>1</sup>, Н. В. Ліснянська<sup>3</sup>*

## РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КАРАГІНАНУ

<sup>1</sup>КЗВО «Рівненська медична академія» Рівненської обласної ради, Рівне, Україна

<sup>2</sup>Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна

<sup>3</sup>ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України», Чернівці, Україна

Згідно з нашим дослідженням застосування 0,5% розчину карагінану щурам у питній воді зумовлювало розвиток пероксидного окиснення ліпідів у тканині печінки, проте меншої інтенсивності, ніж застосування 1% розчину карагінану. Однак 0,5% розчин карагінану стимулює зростання показників антиоксидантного захисту, чим знижує, а в частини досліджуваних тварин нейтралізує процеси вільнорадикального окиснення. Використання 1.0% розчину карагінану призводить до інтенсифікації розвитку оксидативного стресу у тканинах печінки і пригнічення показників антиоксидантної системи.

**Ключові слова:** цукровий діабет, оксидативний стрес, карагінан, антиоксидантна система, печінка.

UDC 616.379-008.64:615.099.036.2-611.36-08

*О. П. Myalyuk<sup>1</sup>, М. І. Marushchak<sup>2</sup>, О. М. Kopanytsya<sup>1</sup>, N. V. Sachuk<sup>1</sup>, N. V. Lisnyanska<sup>3</sup>*

## DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN THE LIVER OF RATS WITH DIABETES MELLITUS AT THE APPLICATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CARRAGEENAN

<sup>1</sup>Municipal Institution of Higher Education "Rivne Medical Academy" of Rivne Region Council, Rivne, Ukraine

<sup>2</sup>I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

<sup>3</sup>Bukovinian Medical University, Chernivtsi, Ukraine

Oxidative stress induced by hyperglycemia triggers the mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell damage and thereby accelerates the progression of diabetes. One of the possible ways to suppress free radical oxidation and increase the effectiveness of diabetes treatment, and prevention of unwanted effects is the correction of body functions with the help of adjuvant therapy with biologically active substances, including carrageenan.

**The aim of the study.** To find out the changes in indicators of free radical oxidation and antioxidant protection in the liver of rats with diabetes when different concentrations of carrageenan are used.

**Materials and Methods.** The study was conducted on 40 white outbred male rats. The subjects were divided into four groups of 10 animals each: 1st group – control (intact animals), 2nd – animals with diabetes, 3rd – animals with diabetes that consumed 0.5% carrageenan solution, 4 and – animals with diabetes that consumed 1.0% carrageenan solution. The concentration of lipid hydroperoxides, active products of thiobarbituric acid, the activity of superoxide dismutase, catalase, and the concentration of reduced glutathione in the liver homogenate were determined.

**Results.** According to our study, the use of a 0.5% carrageenan solution in drinking water for rats led to the development of lipid peroxidation in the liver tissue, but at a lower intensity than the use of a 1% carrageenan solution. With the use of 0.5% carrageenan solution in the experiment, a significant increase in the activity of SOD in the liver homogenate by 41.5%, catalase – by 11.3% compared to the control, and in relation to the 2nd experimental group, the activity of SOD increased by 33.5% ( $p < 0.05$ ), catalase - by 4.76% ( $p < 0.05$ ). Oral administration of 1.0% carrageenan solution also led to an increase in SOD activity in relation to the indicators of intact animals, however, in relation to the 3rd group, the SOD activity indicator decreased by 7.75%. Evaluating the indicators of the 3rd experimental group compared to the 2nd, an increase in the content of reduced glutathione by 13.85% was found ( $p < 0.05$ ). In the group of animals where a 1% carrageenan solution was used, the content of reduced glutathione decreased by 13.85% ( $p < 0.05$ ) compared to the 3rd experimental group.

**Conclusions.** Therefore, 0.5% carrageenan solution stimulates the growth of antioxidant protection indicators, which reduces, and in some of the studied animals, neutralizes the processes of free radical oxidation. The use of 1.0% carrageenan solution leads to the intensification of the development of oxidative stress in liver tissues and inhibition of the indicators of the antioxidant system.

**Key words:** diabetes, oxidative stress, carrageenan, antioxidant system, liver.

**Вступ.** В даний час Всесвітня організація охорони здоров'я визначає ситуацію з цукровим діабетом як

«неінфекційну епідемію». Експерти прогнозують, що до 2025 р у світі буде близько 300 мільйонів хворих на діабет. Міжнародна федерація діабету прогнозує зростання захворюваності в усьому світі до 2030 р. від 8,3

© О. П. Мялюк, М. І. Марущак та ін., 2022

до 9,9% [1]. Значної уваги при діабеті потребує і оксидативний стрес, який відіграє значну роль у виникненні ускладнень і є одним із патогенетичних механізмів при даній патології [2]. Активація вільнорадикального окиснення спостерігається як і при вперше виявленню цукровому діабеті типу 2 (ЦД2), так і при довготривалому перебігу хвороби [3; 4]. Вільні радикали можуть сприяти розвитку гіперглікемії за рахунок дисфункції мітохондрій, а неферментативне глікозилювання – розвиток оксидативного стресу, оскільки глікозилювані білки являються джерелом вільних радикалів [5]. В свою чергу, оксидативний стрес викликає дисфункцію ендотелію, яка грає ключову патогенетичну роль в розвитку мікро- та макроангіопатій. Оксидативний стрес, індукований гіперглікемією, запускає механізми ушкодження  $\beta$ -клітин підшлункової залози і тим самим прискорює прогресування захворювання. Тому одним із можливих шляхів пригнічення вільнорадикального окиснення і підвищення ефективності лікування ЦД2, попередження небажаних ефектів є корекція функцій організму за допомогою допоміжної терапії біологічно активними речовинами, серед яких сульфатовані полісахариди – карагінани, які мають антиоксидантні, гіполіпідемічні, імуномодулюючі, гіпоглікемічні, протизапальні, антикоагулянтні активності і характеризуються відсутністю токсичності [6]. Разом з тим безпечна і ефективна добова доза споживання карагінанів неоднозначна. Адаже є дослідження, які показують, що висока доза карагінану, яка проходить через кишковий епітелій, переноситься через порталний кровоциклін до печінки, зв'язується з TLR4 й індукує прозапальні реакції, а також пригнічує чутливість до інсуліну [7].

**Мета роботи** – з'ясувати зміни показників вільнорадикального окиснення та антиоксидантного захисту у печінці щурів з цукровим діабетом при використанні різних концентрацій карагінану.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проводили на 40 білих безпородних самцях-щурах масою 185–200 г. Тварини утримувалися у віварію ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» на стандартному раціоні відповідно до санітарно-гігієнічних норм та вимог GLP. Всі експерименти виконано з дотриманням норм Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Піддослідних поділили на чотири групи по 10 тварин у кожній: 1-ша група – контроль (інтактні тварини), 2-га – тварини з цукровим діабетом, 3-тя – тварини з цукровим діабетом, що вживали 0,5% розчин карагінану, 4-та – тварини з цукровим діабетом, що вживали 1,0% розчин карагінану.

Цукровий діабет (СТД) моделювали шляхом однократного внутрішньоочеревинного введення тваринам стрептозотоцину (Sigma Aldrich, США, в дозі 60 мг/кг маси тіла) [8]. Безпосередньо перед введенням стрептозоточин розчиняли в 0,1 молярному цитратному буфері (рН 4,5); контрольній групі вводили відповідну кількість цитратного буферу. В експерименті використовували

тварин з рівнем глюкози не нижче 10,8 ммоль/л через 2 тижні після введення стрептозотоцину. Тваринами 3-ї і 4-ї груп був забезпечений вільний доступ до, відповідно, 0,5% і 1,0% розчину карагінану у питній воді протягом 1 місяця [9]. Добову спожиту кількість карагінану ми розраховували по кількості випитої рідини. Щурі в експерименті за добу споживали в середньому  $44,5 \pm 1,8$  мл рідини.

Евтаназію тварин проводили шляхом пункції серця під глибокою анестезією, відповідно до вимог Комітету по догляду за тваринами [10].

Оцінку стану пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) проводили шляхом визначення концентрації гідропероксидів ліпідів (ГП) й активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) у гомогенаті печінки [11; 12]. Антиоксидантний захист був представлений визначенням показників супероксиддисмутази (СОД) [13], активності каталази [14] та концентрації відновленого глутатіону (ВГ) [15].

Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерію Мана–Уїтні [16]. Якщо р-значення знаходилося у межах до 0,05, існував твердий доказ того, що альтернативна гіпотеза вірна, результат вважався статистично значущим.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Активація процесів пероксидного окиснення вказує на пошкодження клітинних мембран, а відтак на розвиток патологічних процесів. Згідно з нашим дослідженням у тварин з цукровим діабетом вміст ГП у тканині печінки зростав на 25,5%, ТБК-АП – на 34,5% ( $p < 0,05$ ) стосовно групи контролю. Встановлено, що застосування 0,5% розчину карагінану щурам у питній воді також зумовлювало розвиток пероксидного окиснення ліпідів у тканині печінки, проте меншої інтенсивності, зокрема, вміст ГП зростав на 10,9%, ТБК-АП – на 24,1% ( $p < 0,05$ ) стосовно контрольної групи. Застосування 1% розчину карагінану щурам у питній воді зумовлювало активацію ПОЛ в тканинах печінки вищої інтенсивності, ніж у 2-й і 3-й дослідних групах, що підтверджується даними таблиці 1. Так, вміст ГП підвищувався на 70,9%, ТБК-АП – на 65,5% ( $p < 0,05$ ) стосовно групи контролю, стосовно 3-ої дослідної групи вміст ГП статистично достовірно зростав на 54,1%, ТБК-АП – на 33,3%.

Антиоксидантний захист – це система інгібування процесів вільнорадикального окиснення, ензимна ланка якої представлена СОД і каталазою. Каталаза – фермент класу оксидоредуктаз, який володіє як каталазно, так і пероксидазною активністю і міститься практично у всіх тканинах, найбільше в печінці, нирках [17]. За умови застосування 0,5% розчину карагінану в експерименті встановлено достовірне зростання активності СОД в гомогенаті печінки на 41,5%, каталази – на 11,3% стосовно контролю, а стосовно 2-ої дослідної групи активність СОД збільшилась на 33,5% ( $p < 0,05$ ), каталази – на 4,76% ( $p < 0,05$ ). Пероральне застосування 1,0% р-ну карагінану також зумовлювало зростання активності СОД стосовно показників інтактних тварин, проте стосовно 3-ої групи показник активності СОД зменшився на 7,75%. Активність каталази

Показники ПОЛ та АОС у печінці щурів за умови вживання різних концентрацій карагінану у питній воді протягом 1 місяця

Показник	Контрольна група 1 (n=10)	Дослідна група 2 (n=10)	Дослідна група 3 (n=10)	Дослідна група 4 (n=10)
ГП, ум.од./мг білка	0,55 [0,53;0,62]	0,69 [0,64;0,73]*	0,61 [0,58;0,69] *(**)	0,94 [0,86;0,97]* (**)
ТБК–АП, мкмоль/мг білка	0,29 [0,25;0,33]	0,39 [0,34;0,42]*	0,36 [0,31;0,40]*	0,48 [0,42;0,49]* (**)
СОД, ум.од./мг протеїну	34,22 [33,21; 37,16]	36,27 [34,23; 39,28]*	48,41 [44,33; 49,69]* (**)	44,93 [41,53; 48,91]*
Каталаза, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв на 1 мг протеїну	111,93 [109,95; 116,83]	118,83 [113,28; 124,03]*	124,49 [122,20; 128,74]* (**)	126,52 [123,38; 129,93]*
Відновлений глутатіон, мкмоль/г	0,77 [0,75;0,81]	0,65 [0,62;0,68]*	0,74 [0,71;0,77]* (**)	0,65 [0,61;0,67]* (**)

Примітка 1. \* – відмінність достовірна стосовно контролю (p<0,05).

Примітка 2. (\*\*) – відмінність достовірна між 2-ю і 3-ю та 3-ю і 4-ю дослідними групами (p<0,05).

у 4-ій дослідній групі зросла лише на 1,63% стосовно 3-ої дослідної групи, що виявилось статистично недостовірним. Враховуючи участь каталази в процесах окиснення, можна вважати, що тканини печінки перебувають у гіпоксії. Накопичення гідрогену пероксиду через недостатню активність каталази, в свою чергу, зумовлює появу ГП.

Відновлений глутатіон виступає одним із акцепторів гідроксильного радикала і синглетного кисню, за рахунок чого знижується деструктивна і цитотоксична дія активних форм кисню за умови патологічного процесу. Крім того, відновлений глутатіон також забезпечує антиоксидантний потенціал глутатіонзалежних ензимів. Аналізуючи отримані результати у 2-ій, 3-тій, 4-тій дослідних групах встановлено статистично достовірне зниження вмісту відновленого глутатіону на 15,58%, 3,90%, 15,58% відповідно, стосовно контрольної групи. Проте, оцінюючи показники 3-тньої дослідної групи щодо 2-ої, виявлено зростання вмісту відновленого глутатіону на 13,85% (p<0,05). В групі тварин, де застосовувався 1% розчин карагінану, вміст відновленого глутатіону стосовно 3-тньої дослідної групи знизився на 13,85% (p<0,05). Вищезазначене вказує на те, що у тканині

печінки організму щура на різницю змін глутатіонової антиоксидантної системи впливає концентрація карагінану, яка використовується. І якщо не зважати на незначимість досліджуваних вибірок, то можна думати, що використання 0,5% розчину карагінану має позитивний антиоксидантний ефект на тканину печінки щура. В той же час використання 1% розчину карагінану призводить до інгібування антиоксидантної системи.

**Висновки.** Отже, пероральне застосування 0,5% і 1,0% розчину карагінану зумовлює розвиток оксидативного стресу у тканинах печінки при цукровому діабеті. Проте 0,5% розчин карагінану стимулює зростання показників антиоксидантного захисту, чим знижує, а в частині досліджуваних тварин нейтралізує процеси вільнорадикального окиснення. Використання 1,0% розчину карагінану призводить до інтенсифікації розвитку оксидативного стресу у тканинах печінки і пригнічення показників антиоксидантної системи. Важливим і перспективним залишається питання впливу різних концентрацій карагінану на тканини нирок і підшлункової залози за наявності цукрового діабету, адже саме ці органи є активними учасниками (органами-мішенями) при даній патології.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. IDF diabetes atlas. 7th ed. International Diabetes Federation; Brussels, Belgium. 2015 [accessed Aug 2016]. URL: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>.
2. Anti-diabetic effects of Sargassum oligocystum on streptozotocin-induced diabetic rat / Akbarzadeh S. et. al. *Indian J. of Basic Med. Sciences*. 2018. № 21(3). P. 342–346.
3. Anti-diabetic potential of selected Malaysian seaweeds / Chin Y. X. et al. *Journal of Applied Phycology*. 2015. № 27(50). P. 2137–2148.
4. Structural organization of rat tissues in experimental combined trauma of the chest and both things / Marushchak M. I. et al. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2022, Volume 8. Issue 1. P. 81–87. DOI 10.11603/ijmmr.2413-6077.2022.1.12903.
5. Pasaoglu H., Sancak B., Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J. Exp. Med*. 2004. № 203(3). P. 211–218.
6. Fitton J. H., Stringer D. N., Kerpinick S. S. Therapies from fucoidan: an update. *Mar. Drugs*. 2015. № 13. P. 5920–5946.
7. Bhattacharyya S., Feferman L., Unterman T., Tobacman J. K. Exposure to common food additive carrageenan alone leads to fasting hyperglycemia and in combination with high fat diet exacerbates glucose intolerance and hyperlipidemia without effect on weight. *J. Diabetes Res*. 2015. Vol. 2015. Article ID 513429. 13 p.
8. Zhang R., Thor D., Han X., Anderson L., Rahimian R. Sex differences in mesenteric endothelial function of streptozotocin-induced diabetic rats: a shift in the relative importance of EDRFs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303 (10). P. H1183–H1198.

## ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

9. Moyana TN, Lalonde JM. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat – a model for inflammatory bowel disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1990; Vol. 20: № 6: 420–426.
10. Reznikov O. General ethical principles of experiments on animals. *Endocrinology*. 2003; No. 8(1):142–145 (In Ukrainian).
11. Temyrbulatov RA, Seleznev EI. The method of increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value. *Laboratory work*. 1981; No. 4: 209–211.
12. Fedorova TN, Korshunova TS, Larsky EG. Reactions with thiobarbituric acid for the determination of malondialdehyde in blood by the fluorimetric method. *Laboratory work*. 1983; No. 3: 25–28.
13. Chevary S, Chaba I, Sekei Y. The role of superoxide reductase in the oxidative processes of the cell and the method of determining it in biological material. *Laboratory work*. 1985; No. 11: 678–681.
14. Koroliuk MA, Ivanova AI, Mayorova IG. Method for determining catalase activity. *Laboratory work*. 1988; No. 1: 16–19.
15. Danielle K., Pelkonen O., Ahokas T. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2012. Vol. 44, № 2. P. 257–265.
16. Zinkevich T., Lisovska V., Stasyuk V. Application of p-value in testing statistical hypotheses. *Securities market of Ukraine*. 2012; No. 1-2: 89–94 (In Ukrainian).
17. Kopanytsia OM, Marushchak MI, Shcherbaty AA. Metabolic processes in the wall of the small intestine, heart and liver during experimental use of carrageenan. *Medical and clinical chemistry*. 2017; Vol. 19, No. 3(72): 108–113 (In Ukrainian).

*Надійшла до редакції 01.12.2022 р.*

*Прийнята до друку 10.12.2022 р.*

*Електронна адреса для листування oksankamp@ukr.net*