Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 369–376
doi: 10.15421/021757

The influence of a selenium-chromium-lipid complex obtained from *Chlorella vulgaris* on the energy metabolism in rats with experimental diabetes

O. Y. Lukashiv, V. V. Grubinko

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 12.06.2017
Received in revised form 28.07.2017
Accepted 29.07.2017

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, M. Kryvonos Str., 2, Ternopil, 46027, Ukraine. Tel.: +38-097-225-34-66. E-mail: lukashiv5@gmail.com

Lukashiv, O. Y., & Grubinko, V. V. (2017). The influence of a selenium-chromium-lipid complex obtained from Chlorella vulgaris on the energy metabolism in rats with experimental diabetes. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 369–376. doi: 10.15421/021757

One of the leading roles in treating diabetes mellitus belongs to chrome ions therapy (III), especially in the complex with selenium (IV). Currently selenium is obtained from unicellular algae, which contain biologically active substances and which are capable of accumulating exogenous microelements. By incubating unicellular algae *Chlorella vulgaris* Biej. in the conditions of aquaculture with sodium selenite (IV) and chromium (III) chloride, we obtained a biologically active lipid substance which contains selenium and chromium. The substance was tested for the impact on energy metabolism of animals exposed to experimentally induced diabetes mellitus. The diabetes was caused by modeling obesity of the animals with further injection of streptozotocin in the amount of 65 mg/kg and nicotinamide at the dose of 230 mg/kg. The rats were intragastrically injected with 1 ml of 1% starch solution which contained a selenium-chrome-lipid complex extracted from the *Chlorella* containing 0.6 µg of selenium, 1.05 µg of chrome and 0.5 mg of lipids for prophylactic, therapeutic and prophylactic-therapeutic purposes; the other group of rats for therapeutic purposes was injected with starch solution with the same composition of microelements in inorganic form – sodium selenite (IV) and chromium chloride (III). This paper presents the results of our study of the impact of organic and inorganic compounds of chrome and selenium on the energetic metabolism of rats exposed to experimental diabetes mellitus. The analysis determined that in the rats' organism, the selenium-chrome-lipid complex from the *Chlorella* improved the indicators of the energetic metabolism – in the group of rats which received it for therapeutic purposes, we observed an up to 7.5 fold increase in the activity of succinate dehydrogenase compared to the rats which did not receive therapeutic treatment. The increase in the activity of succinate dehydrogenase corresponded to the increase in the activity of cytochrome *c* oxidase to 17.2% – in the group of rats injected with the substance for therapeutic purposes. Also, the selenium-chrome-lipid complex activated NADPH-glutamatedehydrogenase in groups of rats which received it for prophylactic and therapeutic-prophylactic purposes. A decrease in NADPH-GDH was observed in all groups of rats which were injected with the *Chlorella* complex, and its activation was observed only in the group of rats injected with inorganic forms of selenium and chrome. In rats injected with the *Chlorella* complex, we observed change in the ratio of NAD and NADPH-GDH towards increase. This indicates the intensification of the energy metabolism in the animals' liver by using aminoacids as energetic substances. In the conditions of injecting inorganic forms of selenium and chrome, the ratio of NAD/NADPH decreased. Therefore, the results allow us to consider the algal complex obtained from *Chlorella* to be effective for regulating the energetic metabolism of subjects suffering from diabetis mellitus compared to the use of inorganic forms of chrome and selenium.

Keywords: microalgae; metabolism; micronutrients; streptozotocin; nicotinamide

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

О. Я. Лукашів, В. В. Грубінко

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна

Унаслідок інкубації одноклітинної водорості *Chlorella vulgaris* Biej. в умовах аквакультури з натрій селенітом і хром (III) хлоридом отримано та виділено стабільну селенхромліпідну субстанцію, вивчено її вплив на щурів з експериментальним цукровим діабетом II типу на тлі ожиріння. Діабет викликали в два етапи: спочатку моделювали аліментарне ожиріння за допомогою висококалорійної дієти та натрію глутамату упродовж чотирьох тижнів, наступним етапом відтворено модель цукрового діабету шляхом внутрішньоочеревинного уведення стрептозотоцину (65 мг/кг) із попереднім уведенням нікотинаміду (230 мг/кг). Щурам з експериментальним діабетом уводили

внутрішньошлунково очищену селенхромліпідну субстанцію із хлорели, що містила 0,6 мкг селену, 1,05 мкг хрому та 0,5 мг ліпідів, у складі 1% водно-крохмальної суспензії в кількості 1 мл із профілактичною, лікувальною та лікувально-профілактичною метою. Іншій групі щурів із лікувальною метою вводили внутрішньошлунково неорганічні форми хрому (III) та селену (IV) у вигляді хром хлориду та натрій селеніту в ідентичній кількості. Наведено результати дослідження впливу органічних (селенхромліпідного комплексу) та неорганічних сполук хрому та селену на енергетичний метаболізм щурів за експериментального цукрового діабету. Під час вживання селенхромліпідного комплексу із хлорели в організмі щурів більшою мірою поліпшувалися показники енергетичного обміну, зокрема активність цитохромоксидази, сукцинатдегідрогенази та глутаматдегідрогенази. Результати дозволяють вважати отриманий водоростевий комплекс із хлорели ефективнішим порівняно з неорганічними формами хрому та селену.

Ключові слова: мікроводорості; обмін речовин; мікроелементи; стрептозотоцин; нікотинамід

Вступ

Пропоноване дослідження – маловивчене в науковій літературі, а тому стаття претендує на оригінальність. Упродовж останніх років не опубліковано жодної ґрунтовної праці, що стосується цієї проблематики. Вітчизняні та зарубіжні вчені здебільшого аналізували вплив неорганічного хрому (Cr^{3+}) на обмінні процеси за цукрового діабету, а також вивчали перспективи використання мікроводорості *Chlorella vulgaris* Biej. у щурів з експериментальним діабетом.

Епідемічний характер поширення захворюваності на цукровий діабет II типу (ЦД 2), що супроводжується ожирінням, – важлива проблема медицини. Близько 80% хворих на ЦД 2 мають надмірну масу тіла (Aguirre et al., 2011), до того ж у людей із помірним ступенем ожиріння частота діабету зростає учетверо, а з різко вираженим – у 30 разів. Дослідження останніх років вказують на значне поширення ожиріння, яке виступає основним фактором ризику не тільки цукрового діабету II типу, а й атеросклерозу, серцево-судинних захворювань і деяких інших патологій (Vlasenko et al., 2011; Laakso and Kuusisto, 2014; Reaven, 2011). Ожиріння визнане Всесвітньою організацією охорони здоров'я як нова неінфекційна епідемія XXI століття. У зв'язку з низьким рівнем фізичної активності, збільшенням у раціоні висококалорійних продуктів, а також неконтрольованим вживанням харчових добавок, наприклад, глутамату натрію, понад половину дорослого населення України має надмірну масу тіла. Останніми роками відмічають постійне збільшення кількості осіб із надлишковою масою тіла та цукровим діабетом II типу, особливо серед працездатного населення, тому ЦД 2 та ожиріння – актуальні проблеми медицини (Vlasenko et al., 2011; Kharroubi and Darwish, 2015). До того ж, діабет і ожиріння супроводжуються розвитком складних супутніх захворювань і ранньою інвалідністю, а також високою смертністю (Islam and Loots, 2009).

Сучасні погляди на етіологію, механізм розвитку та лікування цукрового діабету II типу в основному сконцентровані на дослідженні ролі інсулінорезистентності та порушення функції β-клітин підшлункової залози. Однак недостатня увага приділяється іншим аспектам патогенезу, зокрема особливостям енергетичного обміну, що зумовлюють весь спектр клінічних проявів цього захворювання.

Ефективність функціонування енергетичних систем в організмі – один із критеріїв успішності лікування ЦД (Stancic et al., 2017). Вивчення енергетичного забезпечення може як послужити основою для визначення його ролі в патогенезі ЦД 2, так і бути підставою для розроблення нових методів лікування та профілактики цього захворювання за допомогою корекції виявлених порушень (Tatsumi et al., 1998; Inzucchi et al., 2012). За діабету на тлі активації оксидативного стресу в організмі відбуваються значні зміни молекулярної структури мембран мітохондрій, що зумовлює порушення функціонування ферментних комплексів дихального ланцюга (Mokryy et al., 2016) і, як наслідок, біоенергетичних процесів у клітинах, оскільки вуглеводи не можуть використовуватися для енергетичних потреб печінкою, скелетними м'язами, серцем, нирками (Zanozyna et al., 2010; Stancic et al., 2017).

Незважаючи на досить широкий арсенал сучасних антидіабетичних засобів, проблема реальної компенсації цукрового діабету залишається невирішеною, що обґрунтовує пошук і створення нових ефективних і, водночас, малотоксичних антидіабетичних засобів. Один із найперспективніших способів профілактики порушень обміну речовин – використання біологічно активних добавок (БАД), в яких мінеральні речовини природного походження перебувають у зв'язаній формі у природному комплексі з білками, вуглеводами та ліпідами. Значний інтерес становлять комплекси селену та і біологічно активних металів (Lukashiv et al., 2016).

Селен і хром (III) – важливі мікроелементи для обміну речовин (Vincent, 2012a, 2012b, 2013), бо беруть участь у клітинному захисті від вільнорадикальних реакцій і тому корисні для запобігання значної кількості хвороб і їх лікування (Vincent, 2012b; Selenium, 2003). Хром (III) бере участь у поліпшенні метаболізму в живих організмах, адже він регулює вуглеводний, протеїновий та ліпідний обміни (Brownley et al., 2015; Ganguly, 2016). Численні дослідження (Jain and Kannan, 2001; Cefalu and Hu, 2004; Cheng et al., 2004; Jainet al., 2007; Huaet al., 2012) показали, що хром корисний для лікування інсулінорезистентності та цукрового діабету у людей. У разі недостатнього надходження Cr (III) в організмі виникають метаболічні порушення, симптоми яких схожі на ті, що виникають за діабету та серцево-судинних захворюваннях (Cefalu and Hu, 2004). Cr (III) відіграє важливу роль у підтриманні нормального рівня глюкози в крові (Sundaram et al., 2012), зниженні рівня холестеролу та триацилгліцеролів у плазмі, пригніченні секреції запальних цитокінів, а в комплексі із селеном – інгібує розвиток оксидативного стресу (Jain et al., 2007; Ganguly et al., 2017). Хром підтримує нормальну функцію інсуліну, сприяє транспорту глюкози з крові в клітини печінки, м'язів і жирової тканини.

Щодо хром- і селенумісних препаратів, споживання селенумісних продуктів не може повністю задовольнити потреби людини в селені, як і в багатьох інших мікроелементах, особливо в їх комплексі. Багато сучасних добавок, однак, є синтетичними аналогами вітамінів і мінеральних речовин, вони не зв'язані у біологічні комплекси та можуть мати іншу структуру, ніж натуральні нутрієнти, а також вони часто низькоефективні та можуть виявляти побічні ефекти.

Останнім часом як джерело селену та інших мікроелементів використовують одноклітинні фотосинтезувальні водорості (Zolotor'ova et al., 2008) як джерело біологічно-активних речовин, утворених за рахунок внутрішньоклітинного біосинтезу, що можуть поглинати та накопичувати екзогенні мікроелементи, включаючи їх до складу, насамперед, пігментів, білків та ліпідів (Minyuk, 2000). Досить добре зарекомендували себе, наприклад, препарати з хлорели, не тільки як джерела біологічно доступного хлорофілу, низки вітамінів, амінокислот, а й жирних кислот, що мають антитоксичний (Kim et al., 2009; Lee and Kim, 2009) чи антисклеротичний ефекти (Lee et al., 2008). У попередніх дослідженнях установлено оптимальні умови накопичення селену та мікроелементів клітинами хлорели в аквакультурі (Vinjarska et al., 2014).

Біохімічно виправдане отримання ліпід-селенових субстанцій із хлорели протягом 7 діб вирощування водорості у середовищі з 10,0 мг Se^{4+}/дм^3, а оптимальне для досліджень і перспектив виділення хром-ліпідної субстанції із хлорели використання концентрації хрому 5,0 мг/дм^3 (Vinjarska et al., 2014). У здорових щурів селенхромліпідна субстанція збільшувала сукцинатдегідрогеназну та цитохромоксидазну активності, глутаматдегідрогеназний шлях утворення глутамату, що

сприяло утворенню та активному функціонуванню компонентів антиоксидантної системи (Lukashiv et al., 2016).

Виходячи із цього, мета нашого дослідження – оцінити стан енергетичних процесів у щурів із цукровим діабетом за впливу селенхромліпідного комплексу із *Ch. vulgaris*, а також порівняти вплив неорганічних і органічних сполук хрому та селену на енергетичний метаболізм у щурів за цієї патології.

Матеріал і методи досліджень

Біологічно активну субстанцію отримали шляхом культивування мікропопуляціїї альгологічно чистої культури *Chlorella vulgaris* Beij. CCAP-211/11в в умовах накопичення у середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера та Горхема № 11 за температури +22…+25 ºС та освітлення 2 500 лк 16/8 год (Topachevskyy, 1975). До культури водоростей додавали водний розчин Na_2SeO_3 у розрахунку на Se^{4+} – 10,0 мг/дм^3, та водний розчин $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ з умістом Cr^{3+} – 5,0 мг/дм^3. Біомасу живих клітин відбирали на сьому добу культивування. Контроль – культура, яку вирощували у середовищі без селеніту та іонів хрому.

Ліпіди з включеними в них атомами селену та хрому у процесі метаболізму *in vivo* з біомаси водоростей екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю у відношенні 2 : 1 методом Фолча (Hokin and Hexum, 1992): до однієї масової частки вологої біомаси додавали 20 масових часток екстрагувальної суміші та залишали на 12 год., а неліпідні домішки з екстракту видаляли відмиванням 1% розчином KCl. Загальну кількість ліпідів визначали ваговим методом після відгонки екстрагувальної суміші (Keyts, 1975). Вміст селену в ліпідному екстракті після його озолення нітратною кислотою (HNO_3) в герметичних бюксах за 120 ºС упродовж двох годин визначали спектрофотометрично з о´-фенілендіаміном за довжини хвилі 335 нм (Dedkov and Musatov, 2002), а хрому – після озолення ліпідного екстракту сумішшю нітратної (HNO_3) та сульфатної (H_2SO_4) кислот у герметичних бюксах визначали спектрофотометрично за допомою хромазуролу S за довжини хвилі 556 нм (Yatskiv et al., 2009).

Постановка експерименту. Об'єкт досліджень – білі безпородні щури-самці (125 тварин) початковою масою 160–180 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001), а також керувалися положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Тварин утримували у звичайних умовах віварію. Щури адаптовані 10 діб у дослідній кімнаті, поважені та поділені на сім груп:

I – контрольна група – здорові щури (К);

II–VII – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД):

II – тварини з ЕЦД, виведені з експерименту на 21-шу добу (ЦД 1);

III – тварини з ЕЦД, виведені з експерименту на 35-шу добу (ЦД 2);

IV – тварини з ЕЦД + профілактичне уведення селенхромліпідного комплексу (ЦД + П);

V – тварини з ЕЦД + уведення селенхромліпідного комплексу з лікувальною метою (ЦД + Л 1);

VI – тварини з ЕЦД + лікувально-профілактичне уведення селенхромліпідного комплексу (ЦД + П + Л 1);

VII – тварини з ЕЦД + уведення хром хлориду $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ та натрій селеніту Na_2SeO_3 з лікувальною метою (ЦД + Л 2).

Така кількість експериментальних груп щурів доцільна, оскільки дає змогу не лише дослідити лікувальні властивості селенхромліпідного комплексу із *Ch. vulgaris* за цукрового діабету II типу, а й вивчити його профілактичну дію при факторах ризику діабету, порівняти лікувальний вплив препарату із хлорели з дією неорганічних сполук Cr^{3+} і Se^{4+} за цього захворювання.

Нині відомо понад десять експериментальних моделей цукрового діабету, які застосовуються в науково-медичній практиці. Найпопулярнішим методом моделювання ЦД в експериментальних тварин шляхом уведення їм певних хімічних речовин визнано використання стрептозотоцину (СТЗ) (Grytsiuk et al., 2014). Під час вибору експериментальної моделі стрептозотоцинового цукрового діабету брали за взірець рекомендації Spasov et al. (2011) та низки інших дослідників (Islam and Wilson, 2012), які показали, що у разі превентивного введення нікотинаміду (НА) підвищується стійкість β-клітин острівців Лангерганса до пошкоджувальної дії стрептозотоцину. Ця модель дає змогу змоделювати стан, максимально близький до цукрового діабету II типу, що проявляється розвитком гіперглікемії, глюкозурії без явищ ацидозу.

Виходячи з аналізу літературних джерел (Nolan and Færch, 2012), ми вирішили змоделювати цукровий діабет у два етапи, тобто змоделювати діабет на тлі ожиріння в експериментальних тварин. Перший крок – моделювання аліментарного ожиріння, а наступний – відтворення стрептозотоцин-нікотинамід-індукованої моделі ЦД 2.

Ожиріння моделювали шляхом 4-тижневого призначення висококалорійної дієти, до складу якої входили стандартна їжа (47%), солодке концентроване молоко (44%), кукурудзяна олія (8%), рослинний крохмаль (1%) з додаванням глутамату натрію у співвідношенні 0,6 : 100,0 (дієта #C 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ) (Marushchak and Krynyts'ka, 2012). Ця модель дозволяє викликати аліментарне ожиріння, при цьому зменшується ризик загибелі тварин під час експерименту (He et al., 2008; Luz et al., 2010). Тварини контрольної групи упродовж усього періоду експерименту отримували стандартну їжу та мали вільний доступ до води. Процес відтворення аліментарного ожиріння контролювали шляхом зважування тварин, вимірювання назально-анальної довжини та розрахунку індексу маси тіла (ІМТ) – ділення маси тіла в грамах на довжину в сантиметрах у квадраті (Jeyakumar et al., 2006). Безпосередньо за передніми кінцівками тварини вимірювали окружність грудної клітки (ОГ), перед задніми кінцівками визначали окружність живота (ОЖ). Вимірювання проводили сантиметровою стрічкою з точністю до 1 мм.

Другий етап – одноразове уведення діабетогенного препарату стрептозотоцину фірми «Sigma» (США) внутрішньоочеревинно після попереднього 24-годинного їх голодування за вільного доступу до питної води з розрахунку 65 мг/кг (приготовленого на цитратному буфері) із попереднім (за 15 хв) інтраперитонеальним уведенням нікотинаміду у дозі 230 мг/кг на фізрозчині. Контрольним щурам уводили тільки цитратний буфер.

Тваринам IV групи, починаючи з першого дня введення цитотоксину щодня упродовж 21 доби внутрішньошлунково вводили 1 мл 1% водного крохмального розчину, який містив у собі виділений із хлорели та очищений відмиванням хлороформ-метаноловою сумішшю (2 : 1) та 1% розчином калію хлориду ліпідний екстракт, що містив 0,6 мкг селену, 1,05 мкг хрому у 0,5 мг ліпідів, що співвідноситься із щоденними фізіологічними нормами споживання цих мікроелементів (Forceville et al., 1998; Iskra and Vlizlo, 2013).

Тваринам V групи введення селенхромліпідного комплексу починали з 21-ї доби з моменту введення цитотоксину протягом 14 діб.

Щурам VI групи суспензію призначали з першого дня введення СТЗ упродовж 35 діб.

Тваринам VII групи з 21-ї по 35-ту добу вводили крохмальний розчин натрій селеніту та хром хлориду, який у перерахунку на іони Se^{4+} і Cr^{3+} містив ідентичну добову дозу цих мікроелементів.

Для чистоти експерименту тваринам I та II груп упродовж 21 доби вводили *per os* фізіологічний розчин, тваринам III групи – впродовж 35 діб. Евтаназію щурів I, II та IVгруп здійснювали на 21-шу добу експерименту під тіопенталовим наркозом, евтаназію III, V, VI та VII груп виконували аналогічно на 35-ту добу.

Для досліджень брали печінку та сироватку крові тварин. Печінку (500 мг) використовували для отримання гомогенату

методом диференційної гомогенізації, яку проводили після попередньої перфузії з 5,0 мл фізіологічного розчину. Кров забирали із серця тварин, центрифугували за 3 000 об./хв протягом 30 хв для отримання сироватки.

Розвиток цукрового діабету II типу контролювали за вмістом глюкози у крові (ммоль/л), яку визначали глюкометром «Accu-Chek Active» фірми «Roche Diagnostics GmbH» (Німеччина), рівнем фруктозаміну (Johnson et al., 1982) у сироватці крові, наявністю глюкози («Глюкотест», %) та кетонових тіл у сечі («Ацетонтест», ммоль/л), які визначали за допомогою індикаторних смужок «ПВП «Норма».

Глюкозотолерантний тест проводили на 14-ту добу розвитку ЦД. Кров для досліджень відбирали із хвостової вени щурів.

У печінці визначали активність ензимів енергетичного метаболізму: сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) – за окисненням сукцинату до фумарату фериціанідом калію, що реєстрували спектрофотометрично за довжини хвилі 420 нм (Prohorova, 1982); цитохромоксидази (ЦО, КФ 1.9.3.1) – за конденсацією α-нафтолу та *n*-фенілендіамінгідрохлориду з утворенням фенолу (540 нм) (Straus, 1954); глутаматдегідрогенази (ГДГ, КФ 1.4.1.2) – за швидкістю окиснення НАДН або НАДФН, яке фіксували за 340 нм (Sof'in et al., 1984).

Кількість білків визначали за Lowry et al. (1951).

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики на основі 8–13 повторів. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного пакета Statistica 6.0 (StatSoft, США). Обчислювали середнє арифметичне (M) та стандартну похибку середнього арифметичного (m). Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента після підтвердження нормальності розподілу вибірки. Вірогідною вважали різницю між вибірками за $P < 0,05$.

Результати

Хроматографічний та мас-спектрометричний аналіз селенумісних ліпідів *Ch. vulgaris* (Perales et al., 2006), вирощених за високих концентрацій Se (IV), показав, що селен присутній у всіх фракціях ліпідів, механізм включення елемента до їх складу поки що не зрозумілий. Однак включені в ліпіди селен і метали зв'язуються з ними міцно, оскільки в результаті процедури виділення в їх складі виявляється значна кількість цих мікроелементів. Можливо, це – результат їх включення до складу молекул ліпідів за місцем подвійного зв'язку у ненасичених жирних кислотах або за рахунок міжмолекулярної взаємодії координаційно (Selenium, 2003), що тим самим дозволяє вважати ці комплекси фізіологічно адекватними та збалансованими.

У попередніх експериментах (Lukashiv et al., 2016a, 2016b), які здійснювались на здорових щурах-самцях із масою тіла 160–180 г після введення крохмального розчину селенхромліпідного комплексу, 1 мл якого містив 1,85 мкг селену, 1,1 мкг хрому, 0,5 мг ліпідів один раз на добу упродовж 14 діб, в організмі щурів не виявлено інтоксикації, бо вміст середньомолекулярних пептидів (МСМ) знижувався: $МСМ_1$ – в 1,6 раза, $МСМ_2$ – в 1,4 раза. У печінці та сироватці крові тварин знижувалися вміст малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів, а також підвищувався енергетичний статус (збільшувалася активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази), активувався глутаматдегідрогеназний шлях утворення глутамату, зросла активність каталази та вміст відновленого глутатіону.

Протягом періоду моделювання аліментарного ожиріння відмічалося збільшення маси тіла тварин. Зокрема, аналіз основних анатомо-фізіологічних показників на 28-шу добу експерименту вказує на достовірне підвищення маси тіла щурів дослідної групи на 46,6% та індексу маси тіла – на 33,3%, поряд зі зростанням окружностей живота та грудної клітки, порівняно з контрольною групою (табл.). Таким чином, достовірне зростання біометричних показників щурів дослідної групи свідчить про розвиток ожиріння. Визначення вмісту глюкози та фруктозаміну в крові, а також проведення глюкозотолерантного тесту – одні з визначальних маркерів цукрового діабету. Проведені нами дослідження показали, що на третю добу у тварин з експериментальним цукровим діабетом рівень глікемії зріс у 3,8 раза порівняно з контрольними тваринами (15,9 ± 0,33 ммоль/л). Із 14-ї доби рівень глюкози у крові знизився до 8,9 ± 0,23 ммоль/л і до кінця спостереження майже не змінювався. Також у тварин із діабетом на 21-шу добу індукції ЦД спостерігали істотне підвищення концентрації фруктозаміну у сироватці крові (в 1,9 раза, група ЦД1), що свідчить про активацію процесів неензимного глікозилювання, а також про посилення метаболізації глюкози гексозаміновим шляхом (тобто з утворенням фруктози) в інсулінонечутливих тканинах (Reznikov, 2003).

Таблиця

Біометричні параметри тварин (M ± m)

Показники	Групи щурів	
	контроль, n = 16	ожиріння n = 109
Маса тіла, г	192,1 ± 1,3	281,7 ± 2,0*
Довжина тіла, см	20,02 ± 0,96	20,98 ± 0,44
Індекс маси тіла, г/см^2	0,48 ± 0,02	0,64 ± 0,01*
Окружність грудної клітки, см	11,18 ± 0,53	15,21 ± 0,51
Окружність живота, см	12,76 ± 0,41	18,3 ± 0,55
Окружність живота / окружність грудної клітки	1,14 ± 0,04	1,20 ± 0,03

Примітка: * – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами за $P < 0,05$.

У здорових тварин рівень глюкози у сечі складав 0%, після введення цитотоксину на 3–7-му добу зріс до 0,5%, далі показник становив 0,1%. Із 7-ї доби після введення СТЗ кетонових тіл у сечі не знайдено. Отримані результати вказують на відсутність кетоацидозу, характерного для цукрового діабету I типу.

Проведений глюкозотолерантний тест показав, що у тварин з експериментальним ЦД рівень глікемії через дві години з моменту введення глюкози становив 13,4 ± 0,52 ммоль/л, у тварин контрольної групи – 5,6 ± 0,62 ммоль/л. Результати свідчать про порушення толерантності до глюкози у щурів з ЕЦД.

Основні біохімічні процеси, що мають відношення до енергетичного обміну та відбуваються в мітохондріях, – цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса), β-окиснення жирних кислот, карнітиновий цикл, транспорт електронів у дихальний ланцюг і окисне фосфорилювання. Кожен з них може бути причиною мітохондріальної дисфункції (Morino et al., 2006; Grattagliano et al., 2012). Враховуючи велику кількість ензимів, що беруть участь у генеруванні енергії в клітині, у нашому дослідженні визначено активність ключового ензиму циклу трикарбонових кислот (сукцинатдегідрогенази) та електронотранспортного ланцюга (цитохромоксидази), а також глутаматдегідрогеназну активність, яка пов'язує енергетичні та біосинтетичні процеси в клітині.

Адекватне відображення вираженості дисметаболічних процесів і стану енергетичного обміну – активність сукцинатдегідрогенази (СДГ). СДГ належить до сукцинатоксидазної системи ферментів, об'єднаних у ланцюг у мітохондріях. СДГ – перший ензим цієї системи, цитохромоксидаза – останній. Їх активність відображає енергетичний потенціал клітини, функціональний стан і кількість активних мітохондрій. Деякі автори (Readon et al., 1992) зазначають, що ЦД має перше місце серед ендокринопатій, виявлених за мітохондріальної патології. Здійснюючи окиснення в організмі, СДГ бере участь у знешкодженні токсинів і недоокиснених продуктів, що з'являються у хворих на ЦД. Активність цього ензиму – показник окисного метаболізму у клітинах діабетиків (Ferreica et al., 2003).

У тварин на 21-шу добу розвитку ЦД активності ЦО та СДГ у печінці знизилися відповідно на 20,0% і 10,5%, порівняно з контрольною групою (рис. 1). При ЦД 2 з ожирінням внутрішньоклітинний рівень НАДФН, як правило, підвищуються, що викликає збільшення продукції супероксид-радикалів, посилення оксидативного стресу та появу деструктивних процесів у ткани-

нах (Gupte et al., 2009). У наших дослідженнях у щурів із діабетом активність НАДФН-ГДГ (рис. 2) зросла учетверо порівняно з контролем, НАДН-ГДГ знизилася лише на 2,3%, а співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ зменшилося в 4,1 раза.

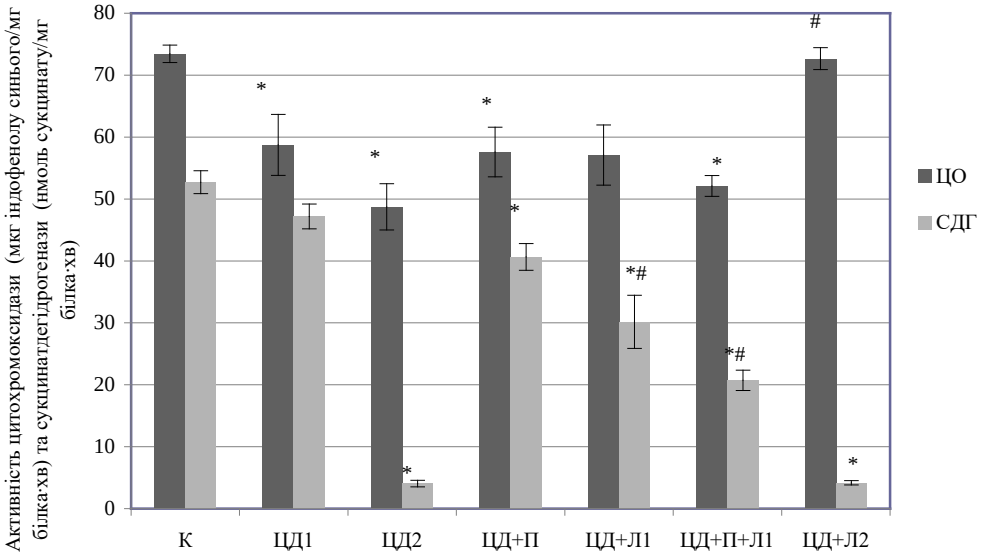

Рис. 1. Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази у печінці щурів після застосування селенхромліпідного комплексу та введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+} (M ± m; n = 8–13): різниця показників достовірна (P < 0,05) відносно * – контрольної групи (К), # – відносно групи ЦД 2

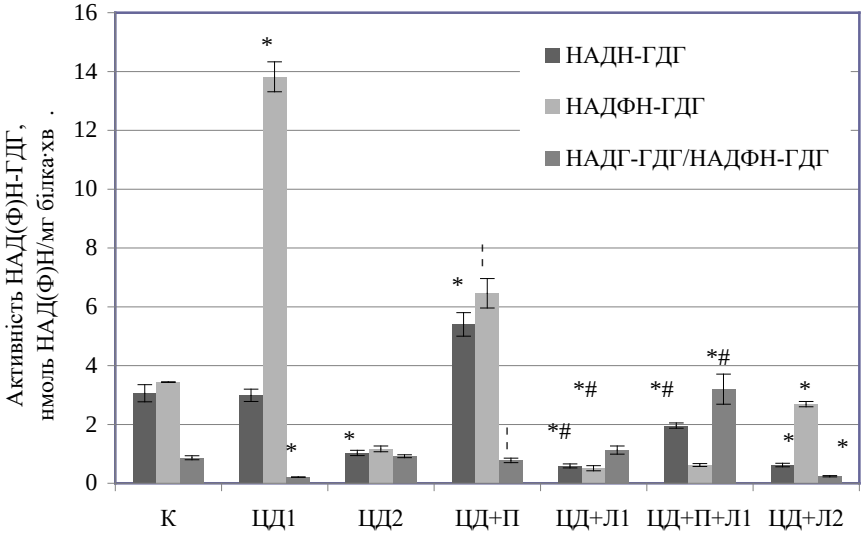

Рис. 2. Активність НАДН- та НАДФН-глутаматдегідрогеназ і їх співвідношення у печінці щурів після застосування селенхромліпідного комплексу та введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+} (M ± m; n = 8–13): різниця показників достовірна (P < 0,05) відносно: * – контрольної групи (К), ¦ – відносно групи ЦД1, # – відносно групи ЦД 2

Виявлені зміни відповідають клінічній картині, що супроводжує розвиток діабету та узгоджується з метаболічними порушеннями у хворих на інсуліннезалежний ЦД. За введення селенхромліпідного комплексу відмічається підвищення активності СДГ (рис. 1), зокрема, у групі ЦД + Л 1 її активність збільшилася у 7,5 раза порівняно з групою ЦД 2, у групі ЦД + Л 2 збільшення відбулося лише на 3%, а у групі ЦД + П + Л 1 – у 5,2 раза.

Підвищення сукцинатдегідрогеназної активності узгоджується з підвищенням активності цитохромоксидази: у групі ЦД + Л 1 відмічається поліпшення активності ЦО на 17,2%, у групі ЦД + Л 2 – на 49,1% та на 7,0% у групі ЦД + П + Л 1 (рис. 1). Активність СДГ і ЦО у щурів, яким уводили селенхромліпідний комплекс із профілактичною метою, незначно знизилася.

НАДН-глутаматдегідрогеназна активність за дії селенхромліпідного комплексу із хлорели достовірно зросла на 80,6% у групі ЦД + П порівняно з групою ЦД 1, у групі ЦД + Л 1 та ЦД + Л 2 (за введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+}) активність НАДН-ГДГ знизилася на 43,0% і 39,8%, відповідно, а у групі ЦД + П + Л 1 зросла на 90,3% щодо показника тварин групи ЦД2 (рис. 2).

Активність НАДФН-ГДГ за введення щурам селенхромліпідного комплексу із хлорели також суттєво зменшувалася у групі ЦД + П (в 2,1 раза відносно групи ЦД 1), а за споживання щурами селенхромліпідного комплексу груп ЦД + Л 1 та ЦД + П + Л 1 достовірно знизилася в 2,3 та 1,9 раза, лише за введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+} показник зріс в 1,9 раза щодо показника у тварин групи ЦД 2 (рис. 2).

В експерименті спостерігали зростання показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ (рис. 2) в усіх групах тварин, яким уводили селенхромліпідний комплекс, більшою мірою у групі ЦД + П – в 3,7 раза (щодо групи ЦД1) та у групі ЦД + П + Л 1 – в 3,5 раза відносно групи ЦД2. Зростання співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ свідчить про активізацію каталітичної ланки нітрогенового метаболізму в організмі тварин. Суттєве зниження показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ відмічалося у групі щурів, яким уводили неорганічні форми Cr^{3+} та Se^{4+} відносно групи ЦД 2, а у групі ЦД + Л 1 показник зріс в 1,2 раза.

Отримані результати свідчать про активізацію енергетичного метаболізму за введення селенхромліпідних комплексів із хлорели на фоні ЦД 2 як на рівні циклу Кребса, так в термінальній фазі дихального ланцюга, а також про використання амінокислот як енергетичного субстрату.

Обговорення

Експериментально відтворений цукровий діабет II типу відзначається порушенням метаболізму в організмі щурів, що підтверджується результатами комплексних біохімічних досліджень. Глибокі розлади енергетичного обміну виникають за діабету, коли значно зменшується вироблення макроергічних сполук у зв'язку з порушенням дихального ланцюга, зумовленим обмеженням потужності циклу Кребса (Ferreica et al., 2003).

Адекватне відображення вираженості дисметаболічних процесів і стану енергетичного обміну – зменшення активності цитохромоксидази, сукцинатдегідрогенази, НАДН-глутаматдегідрогенази, активізація діяльності НАДФН–ГДГ, а також зниження співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ.

Спрямованість глутаматдегідрогеназної реакції, напрям якої визначається наявністю коферменту (НАД-залежна – пряма, НАДФ-залежна – зворотна), зумовлює напрям метаболізму (Metzler, 2003; Dudina, 2005). У прямій реакції відбувається дезамінування глутамату з утворенням 2-оксоглутарату з подальшим його використанням у циклі Кребса або інших метаболічних системах, виконуючи енергетичну функцію. У зворотній реакції фермент спрямовує метаболізм у бік біосинтезу амінокислот (синтетазний шлях). Закономірності активності глутаматдегідрогенази з $НАД^+$ та $НАДФ^+$ свідчать про переважання утворення глутамату над його дезамінуванням, тобто активізацію зв'язування аміаку як один із дієвих детоксикаційних механізмів, який розвивається під час використання амінокислот як енергетичних субстратів у стресових і патологічних станах (Grubinko and Arsan, 1998).

Результати досліджень співвідносяться з даними окремих авторів (Shibata et al., 2003; Jeong et al., 2009) про те, що хлорела може бути корисною для профілактики діабету та розвитку діабетичних ускладнень, а також володіє гіпоглікемічним ефектом. Завдяки властивостям *Ch. vulgaris* акумулювати із середовища культивування іони неметалів і металів, а також накопичувати екзогенні мікроелементи, включаючи їх у значній кількості до складу ліпідів, антидіабетична дія хлорели посилюється. Пероральне введення в організм лабораторних щурів з експериментальним діабетом селенхромліпідного комплексу з *Ch. vulgaris* покращило енергетичний статус щурів.

З огляду на дані, відображені в рисунках 1 та 2, можна узгодити їх із твердженнями, наведеними Cefalu et al. (2004) про те, що відповідь організму на дію Cr^{3+} та Se^{4+} залежить від форми його введення. Добавки хрому використовують у вигляді неорганічних (в основному це хлорид хрому) та органічних (нікотинат хрому, піколінат хрому, цитрат хрому, ацетат хрому) сполук, а також у вигляді хромумісних дріжджів. На думку деяких дослідників, неорганічні сполуки хрому мають нижчий рівень засвоєння цього елемента в організмі порівняно з органічними сполуками, не зв'язані у біологічні комплекси та можуть мати іншу структуру, ніж натуральні нутрієнти; вони часто проявляють низьку ефективність і можуть виявляти побічні ефекти. Згідно з даними Vincent (2012), біозасвоєння хрому з неорганічних сполук невисоке (до 1%), однак воно зростає до 25% за надходження хрому у вигляді органічних сполук (піколінати, нікотинати, цитрати). Таким чином, результати досліджень дозволяють зробити обґрунтований висновок про те, що використання селенхромліпідного комплексу, виділеного із хлорели, дає набагато більший терапевтичний ефект при змодельованому ЦД, і є ефективнішим, порівняно з неорганічними сполуками, засвоєння яких в організмі набагато нижче.

Висновки

Дослідження дозволило вперше ґрунтовно вивчити вплив ліпідів *Ch. vulgaris* за спільної дії Cr^{3+} та Se^{4+} на енергетичний метаболізм щурів за змодельованого ЦД 2. Селенхромліпідний комплекс проявляє вплив на обмінні процеси в організмі тварин за експериментального цукрового діабету.

Отримані результати – зростання рівня фруктозаміну, глікемії, глюкозурії, відсутність кетонурії, а також оцінка динаміки глікемії під час проведення орального тесту толерантності до глюкози у щурів, за якого рівень глікемії через 2 години від моменту введення глюкози залишався вищим за 13 ммоль/л, свідчили про розвиток ЦД 2 у щурів.

Із *Ch. vulgaris* в умовах аквакультури виділено стабільний селенхромліпідний комплекс, за введення якого щурам з експериментальним цукровим діабетом у дозі з 0,6 мкг селену, 1,05 мкг хрому в 0,5 мг ліпідів на 1 мл 1% водно-крохмальної суспензії у печінці відбувалося підвищення активностей сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази. Виняток становлять лише ті групи тварин, яким уводили селенхромліпідний комплекс із профілактичною метою, у них активність досліджених ензимів незначно знизилася.

Селенхромліпідний комплекс активував НАДН-глутаматдегідрогеназу у групах щурів, яким його вводили з профілактичною та лікувально-профілактичною метою. Відбулося зниження НАДФН-ГДГ у всіх групах щурів, яким уводили комплекс із *Ch. vulgaris*, його активацію відмічали лише у групі щурів, яким уводили неорганічні форми селену та хрому. За введення селенхромліпідного комплексу з мікроводорості відбулася зміна співвідношення активності $НАД^+$ та $НАДФ^+$-ГДГ у бік зростання (до 3,7 раза у групі ЦД + П), що свідчить про прискорення у печінці експериментальних тварин енергетичного метаболізму з використанням як енергетичних субстратів амінокислот. За введення неорганічних форм селену та хрому співвідношення НАДН/НАДФН знижується.

Результати показали позитивний вплив селенхромліпідного комплексу з *Ch. vulgaris* на енергетичний обмін щурів з експериментальним ЦД 2 над неорганічними формами хрому та селену. Це дозволяє вважати даний комплекс із хлорели перспективним регулятором енергетичного метаболізму за цукрового діабету.

References

Aguirre, L., Arias, N., Macarulla, T., Gracia, A., & Portillo, M. (2011). Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. The Open Nutraceuticals Journal, 4, 189–198.

Brownley, K. A., Boettiger, C. A., Young, L. A., & Cefalu, W. T. (2015). Dietary chromium supplementation for targeted treatment of diabetes patients with comorbid depression and binge eating. Medical Hypotheses, 85(1), 45–48.

Cefalu, W. T, & Hu, F. B. (2004). Role of chromium in human health and in diabetes. Diabetes Care, 27(11), 2741–2751.

Cheng, H. H., Lai, M. H., Hou, W. C., & Huang, C. L. (2004) Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(5), 1385–1389.

Dedkov, Y. M., & Musatov, A. V. (2002). Selen: Byolohycheskaya rol', khymycheskye svoystva y metody opredelenyya [Selenium: Biological role, chemical properties and methods of determination]. Chemistry, 1688, 19–23 (in Russian).

Dudina, Y. V. (2005). Effect of kainate-induced experimental epilepsy on NADPH-diaphorase and calcium-binding proteins in rat hippocampal neurons. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 139(3), 309–312.

Ferreica, F. M., Palmeira, C. M, Seica, R., Moreno, A. J., & Santos, M. S. (2003). Diabetes and mitochondrial bioenergetics: Alterations with age. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17(4), 214–222.

Forceville, X., Vitoux, D., Gauzit, R., Combes, A., Lahilaire, P., & Chappuis, P. (1998). Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis and outcome incritically ill patients. Critical Care Medicine, 26(9), 1536–1544.

Ganguly, R., Sahu, S., Ohanyan, V., Haney, R., Chavez, R., Shah, S., Yalamanchili, S., & Raman, P. (2017). Oral chromium picolinate impedes hyperglycemia-induced atherosclerosis and inhibits proatherogenic protein TSP-1 expression in STZ-induced type 1 diabetic ApoE-/- mice. Scientific Reports, 7, 45279.

Ganguly, R., Wen, A. M., Myer, A. B., Czech, T., Sahu, S., Steinmetz, N. F., & Raman, P. (2016). Anti-atherogenic effect of trivalent chromium-loaded CPMV nanoparticles in human aortic smooth muscle cells under hyperglycemic conditions *in vitro*. Nanoscale, 8(12), 6542–6554.

Grattagliano, I., de Bari, O., Bernardo, T. C., Oliveira, P. J., Wang, D. Q., & Portincasa, P. K. (2012). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease – from origin to propagation. Clinical Biochemistry, 45, 610–618.

Grubinko, V. V., & Arsan, V. O. (1998). Rol' hlutamat – hlutaminovoho peretvorennya v rehulyatsiyi homeostazu v mozku tvaryn za stres-diyi faktoriv zovnishn'oho seredovyshcha [The role of glutamate-glutamine in the regulation of homeostasis in the brain of animals subject to stress-action from environmental factors]. Ecological Physiology, 1, 13–18 (in Ukrainian).

Grytsiuk, M. I., Boychuk, T. N., & Petryshyn, A. I. (2014). Porivnyal'na kharakterystyka eksperymental'nykh modeley diabetu [Comparative characteristic of experimental models of diabetes]. World of Medicine and Biology, 44, 199–203 (in Ukrainian).

Gupte, R. S., Floyd, B. C., Kozicky, M., George, S., Ungvari, Z. I., Neito, V., Wolin, M. S., & Gupte, S. A. (2009). Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. Free Radical Biology and Medicine, 47(3), 219–228.

He, K., Zhao, L., Daviglus, M. L., Dyer, A. R., Van Horn, L., Garside, D., Zhu, L., Guo, D., Wu, Y., Zhou, B., & Stamler, J. (2008). Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: The INTERMAP study. Obesity, 16(8), 1875–1880.

Hokin, L. E., & Hexum, T. D. (1992). Studies on the characterization of the sodium – potassium transport adenosinetriphosphatase on the role of phospholipids in the enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics, 151(2), 58–61.

Hua, Y., Clark, S., Ren, J., & Sreejayan, N. (2012). Molecular mechanisms of chromium in all eviating insulin resistance. Journal of Nutritional Biochemistry, 23(4), 313–319.

Inzucchi, S., Bergenstal, R. M., & Buse, J. B. (2012). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A patient-centered approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care, 35, 1–16.

Iskra, R. Y., & Vlizlo, V. V. (2013). Osoblyvosti funktsionuvannya systemy antyoksydantnoho zakhystu v erytroyidnykh klitynakh i tkanynakh svyney za diyi khromu khlorydu [Peculiarities of functioning of the system of antioxidant protection in erythroid cells and tissues of pigs under the action of chromium chloride]. Ukrainian Biochemical Journal, 85(3), 96–102 (in Ukrainian).

Islam, M. S., & Wilson, R. D. (2012). Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. Methods in Molecular Biology, 933, 161–174.

Islam, S., & Loots, D. T. (2009). Experimental rodentmodels of type 2 diabetes: A rewiev. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 31(4), 249–261.

Jain, S. K., & Kannan, K. (2001). Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-a secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 289, 687–691.

Jain, S. K., Rains, J. L., & Croad, J. L. (2007). High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. Antioxidants and Redox Signaling, 9, 1581–1590.

Jeong, H., Kwon, H., Kim, M. (2009). Hypoglycemic effect of *Chlorella vulgaris* intake in type 2 diabetic Goto Kakizaki and normal Wistar rats. Nutrition Research and Practice, 3(1), 23–30.

Jeyakumar, S. M., Vajreswari, A., & Giridharan, N. V. (2006). Chronic dietary vitamin A supplementation regulates obesity in an obese mutant WNIN/Ob rat model. Obesity, 14, 52–59.

Johnson, R. N., Metcalf, P. A., & Baker, J. R. (1982). Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clinica Chimica Acta, 127(1), 87–95.

Keyts, M. (1975). Tekhnika lipidolohii. Vydelenie, analiz i identifikatsiya lipidov [Technique of lipidology. Isolation, analysis, identification of lipids]. Mir, Moscow (in Russian).

Kharroubi, A. T, & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World Journal of Diabetes, 6(6), 850–867.

Kim, Y. J., Kwon, S., & Kim, M. K. (2009). Effect of *Chlorella vulgaris* intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. Nutrition Research and Practice, 3(2), 89–94.

Laakso, M., & Kuusisto, J. (2014). Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. Nature Reviews Endocrinology, 10(5), 293–302.

Lee, H. S., Park, H. J., & Kim, M. K. (2008). Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. Nutrition Research and Practice, 2(4), 204–210.

Lee, H. S., & Kim, M. K. (2009). Effect of *Chlorella vulgaris* on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet. Journal of Medicinal Food, 12(5), 1029–1037.

Lowry, O. H., Rosenbroug, N. I., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, 193(1), 265–275.

Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., & Grubinko, V. V. (2016). Vplyv na metabolichni protsesy v orhanizmi selenovmisnykh biodobavok ta perspektyvy yikh vykorystannya [Effect on metabolic processes in the organism of selenium-containing bio-supplements and prospects for their use]. Bulletin of Biology and Medicine, 130, 30–34 (in Ukrainian).

Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., Vasilenko, O. V., & Grubinko, V. V. (2016). The effect of selenium-chrome-lipid substance from *Chlorella vulgaris* Biej. on energy metabolism in rats. World Science, 7(11), 17–21.

Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., Vinyars'ka, H. B., & Grubinko, V. V. (2016). Vplyv selen-khrom-lipidnoyi substantsiyi iz *Chlorella vulgaris* Biej. na oksydatyvnyy status shchuriv [Effect of selenium-chromium-lipid substance on *Chlorella vulgaris* Biej. the oxidative status of rats]. Medical and Clinical Chemistry, 18(2), 28–33 (in Ukrainian).

Luz, J., Pasin, V. P., Silva, D. J. M., Zemdegs, J. C., Amaral, L. S., & Affonso-Silva, S. M. (2010). Effect of food restriction on energy expenditure of monosodium glutamate-induced obese rats. Nutrition and Metabolism, 56(1), 31–35.

Marushchak, M. I., & Krynyts'ka, I. Y. (2012). Sposib modelyuvannya alimentamoho ozhyrinnya [A way to model alimentary obesity]. Patent of Ukraine No 68839, MPK G09B 23/28 (2006.01), A61K 31/195 (2006.01), application number u201112114 (in Ukrainian).

Metzler, D. E. (2004). Biochemistry: The chemical reactions of living cells. 2nd ed. Academic Press, New York – London.

Minyuk, G. S., & Drobetskaya, I. V. (2000). Vliyaniye selena na zhiznedeyatel'-nost' morskikh i presnovodnykh mikrovodorosley [Effect of selenium on the activity of marine and freshwater microalgae]. Ecology of the Sea, 54, 26–37 (in Russian).

Mokryy, V. Y., Ziablitsev, S. V., & Kryshtal', M. V. (2016). Osoblyvosti formuvannya okysnoho stresu u patsiyentiv z tsukrovym diabetom 2 typu v zalezhnosti vid tryvalosti zakhvoryuvannya i stati [Features of the formation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes, depending on the duration of the disease and sex]. International Endocrinology Journal of the Year, 77, 67–71 (in Ukrainian).

Morino, K., Petersen, K., Shulman, F., & Morino, G. I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. Diabetes, 55(2), 9–15.

Nolan, J. J., & Færch, K. (2012). Estimating insulin sensitivity and beta-cell function: Perspectives from the modern pandemics of obesity and type 2 diabetes. Diabetologia, 55(11), 2863–2867.

Perales, H. V., Pena-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere, 64, 1–10.

Prokhorova, M. I., ed. (1982). Metody biokhimichnykh doslidzhen' (lipidnyy ta enerhetychnyy metabolizm) [Methods of biochemical studies (lipid and energy metabolism)]. Leningrad University Press, Leningrad (in Russian).

Reardon, W., Ross, R. J., Sweeney, M. G., Luxon, L. M., Pembrey, M. E., Harding, A. E., & Trembath, R. C. (1992). Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. Lancet, 8832, 1376–1379.

Reaven, G. M. (2011). Relationships among insulin resistance, type 2 diabetes, essential hypertension, and cardiovascular disease: Similarities and differences. Journal of Clinical Hypertension (Greenwich), 13(4), 238–243.

Reznikov, O. G. (2003). Zagal'ni etytchni pryncypy eksperymentivna tvarynach [General ethical principles of experiments on animals]. The first national congress on bioethics. Endocrinology, 8(1), 142–145.

Shibata, S., Natori, Y., Nishihara, T., Tomisaka, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Nguyen, V. (2003). Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 49(5), 334–339.

Sof'yn, A. V., Shatylov, V. R., & Kretovych, V. L. (1984). Hlutamatdehydrohenazy odnokletochnoy zelenoy vodorosly. Kynetycheskye svoystva [Glutamate dehydrogenase of unicellular green algae. Kinetic properties]. Biochemistry, 49(2), 334–345 (in Russian).

Spasov, A. A., Voronkova, M. P., Snyhur, H. L., Cheplyaeva, N. Y., & Chepurnova, M. V. (2011). Eksperymental'naya model' sakharnoho dyabeta typa 2 [Experimental model of type 2 diabetes]. Biomedicine, 3, 12–18 (in Russian).

Stancic, A., Filipovic, M., Ivanovic-Burmazovic, I., Masovic, S., Jankovic, A., Otasevic, V., Korac, A., Buzadzic, B., & Korac, B. (2017). Early energy metabolism-related molecular events in skeletal muscle of diabetic rats: The effects of l-arginine and SOD mimic. Chemico-Biological Interactions, 272, 188–196.

Straus, W. (1954). Colorimetric microdetermination of cytochromeoxidase. Journal of Biological Chemistry, 207(2), 733–743.

Sundaram, B., Singhal, K., & Sandhir, R. (2012). Ameliorating effect of chromium administration on hepatic glucose metabolism in streptozotocin-induced experimental diabetes. Biofactors, 38, 59–68.

Tatsumi, T., Matoba, S., Kobara, M, Keira, N., Kawahara, A., Tsuruyama, K., Tanaka, T., & Katamura, M. (1998). Energy metabolism after ischemic preconditioning in streptozotocin-induced diabetic rat hearts. Journal of the American College of Cardiology, 31(3), 707–715.

Vincent, J. B. (2012). Is chromium effective as a nutraceutical. The bioinorganic chemistry of chromium, 55–79.

Vincent, J. B. (2012). Is chromium essential the evidence. The bioinorganic chemistry of chromium, 7–30.

Vincent, J. B. (2012). Is chromium (III) effective as a therapeutic agent. The bioinorganic chemistry of chromium, 81–123.

Vincent, J. B. (2013). Chromium: Isitessential, pharmacologically relevant, ortoxic? Metal Ions Life Sciences, 13, 171–198.

Vlasenko, M., Semenyuk, I., & Slobodyanyuk, G. (2011). Diabet i ozhyrinnya – epidemiya XXI stolittya: Suchasnyy pidkhid do problemy [Diabetes and obesity – The epidemic of the XXI century: A modern approach to problems]. Ukrainian Therapeutic Journal, 2, 50–55 (in Ukrainian).

Yatskiv, O. S., & Patsay, Y. O. (2009). Spektrofotometrychne vyznachennya Cr (III) z dopomoyu khromazurolu S v prysutnosti Cr (VI) [Spectrophotometric determination Cr (III) with chromazoorol S in the presence of Cr (VI)]. Methods and Objects of Chemical Analysis, 4(1), 43–47 (in Ukrainian).

Zanozyna, O. V., Borovkov, N. N., & Shcherbatyuk, T. H. (2010). Svobodnoradykal'noe okyslenye pry sakharnom dyabete 2-ho typa: Ystochnyky obrazovanyya, sostavlyayushchye, patohenetycheskye mekhanyzmy toksychnosty [Free radical oxidation in type 2 diabetes, sources of formation, constitutive, pathogenetic mechanisms of toxicity]. Modern Technology in Medicine, 3, 104–112 (in Russian).

Zolotor'ova, O. K., Shnyukova, E. I., Sivash, O. O., & Mikhaylenko, N. F. (2008). Perspektivi vikoristannya mikrovodorostey u biotekhnologiyi [Prospects for the use of microalgae in biotechnology]. Al'terpres, Kyiv (in Ukrainian).