

Бутолин Е.Г.<sup>1</sup>, Данилова О.В.<sup>2</sup>, Канунникова О.М.,  
Чучкова Н.Н.<sup>1</sup>, Сметанина М.В.<sup>1</sup>, Кожевников В.И.<sup>2</sup>, Трубачев А.В.<sup>2</sup>

## **Исследование эффективности применения воды, пересыщенной воздухом, для снижения тяжести последствий окислительного стресса у лабораторных животных. III. Сахароснижающее действие артезианской воды с нанопузырьковой газовой фазой: исследования на лабораторных крысах в условиях гиперкалорийной диеты и экспериментального сахарного диабета**

1- ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, Ижевск, 2- ФГБУН Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Ижевск

Butolin E.G., Danilova O.V., Kanunnikova O.M., Chuchkova N.N., Smetanina M.V., Kozhevnikov V.I., Trubachev A.V.

## **Effect of use of water, supersaturated with air, to reduce the severity of the consequence of laboratory animals oxidative stress. II. The hypoglycemic action of artesian water with gas nanobubble phase studied on lab rats in conditions of hypercaloric diet and experimental diabetes**

### **Резюме**

Исследовано влияние воды с газовыми нанопузырьками на состояние и биохимические показатели крови крыс в условиях гиперкалорийной диеты и экспериментального диабета. Наблюдается благоприятное действие воды с нанопузырьками на крыс в условиях гиперкалорийной диеты и с экспериментальным аллоксановым и стрептозоциновым диабетом. У крыс, находящихся на несбалансированном рационе питания, включающем избыток жиров и углеводов, употребление воды с нанопузырьковой фазой сохраняет баланс в отношении показателей гликозилированного гемоглобина, способствует снижению веса и количества холестерина в сыворотке. У животных с экспериментальным диабетом прием обработанной воды в отсутствие сахароснижающей терапии приводит к понижению уровней глюкозы и гликозилированного гемоглобина. Эффект от приема воды в большей степени проявляется на крысах с аллоксановым диабетом. Действие газовых нанопузырьков подобно действию препаратов-антиоксидантов.

**Ключевые слова:** аллоксановый диабет; стрептозоциновый диабет; гиперкалорийная диета; вода; газовая нанопузырьковая фаза; биохимический анализ крови

### **Summary**

The influence of water with gas nanobubbles on the condition and biochemical parameters of blood of rats in conditions of hypercaloric diet and experimental diabetes was studied. The beneficial effect of water with gas nanobubbles on rats in conditions of a reduced-calorie diet and streptozocin and experimental alloxan diabetes is observed. In rats, which were on an unbalanced diet, including excess fat and carbohydrates, the use of water with nanobubbles maintains a balance in terms of glycosylated hemoglobin, helps to reduce the weight and amount of cholesterol in the serum. In rats with experimental diabetes, the intake of treated water by rats, in the absence of hypoglycemic therapy, leads to a decrease in glucose levels and glycosylated hemoglobin. The effect of water intake is more pronounced in rats with alloxan diabetes. The action of the gas nanobubbles similarly the action of drugs-antioxidants.

**Key words:** alloxan diabetes; streptozocin diabetes; hypercaloric diet; water, gas nanobubbles; blood biochemical analysis

## Введение

Сахарный диабет и ожирение являются актуальной проблемой современной эндокринологии. На сегодняшний день лечение сахарного диабета направлено на снижение уровня глюкозы путем восполнения дефицита инсулина и повышения утилизации глюкозы периферическими тканями за счет применения сахароснижающих препаратов. Подобная тактика лечения не учитывает необходимость воздействия и на другие звенья патогенеза СД, лежащие в основе развития диабетических осложнений [1-3].

Гипергликемия является одним из главных клинических симптомов диабета и основным фактором развития ряда хронических осложнений, таких как артериосклероз, сердечно-сосудистые заболевания [4-6]. При хронически высоком уровне глюкозы в крови возрастает производство активных форм кислорода вследствие гликирования белков и автоокисления глюкозы [7, 8], создаются помехи в работе антиоксидантной системы защиты организма [9].

Установлена четкая корреляционная зависимость между гипергликемией и степенью выраженности окислительного стресса [10].

Таким образом, важно не только снижать уровень глюкозы в крови, но и уменьшать окислительный стресс в организме для снижения риска и уменьшения тяжести осложнений диабета. Поэтому для лечения диабетических осложнений (в дополнение к сахароснижающей терапии) используют антиоксиданты [11, 12], такие как кверцетин, аскорбат, и бета-каротин, антиоксидантные биогенные вещества [13-17], натуральные пищевые экстракты с антиоксидантной активностью [18-23].

Имеются исследования о положительном влиянии минеральной воды (в частности, бикарбонатной и магниевой) на улучшение гликемических показателей [24, 25]. Есть сообщения об эффективности использования омагниченной воды для снижения окислительного стресса при диабете [26]. Однако подтвердить или опровергнуть этот вывод не представляется возможным из-за недостаточности экспериментальных исследований. Известно, что не только омагничивание, но и другие виды внешних воздействий повышают биологическую активность воды.

В данной работе обобщены результаты наших исследований действия воды с нанопузырьковой газовой фазой на содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина лабораторных животных в условиях гиперкалорийной диеты (состояние преддиабета), и с экспериментальным диабетом.

## Материалы и методы

Объектами исследования являлись половозрелые беспородные белые лабораторные крысы: три группы по 10 крыс.

Гиперкалорийная диета рассчитана согласно рекомендациям [27] по вскармливанию. В сутки крыса массой 200 г потребляет: 4.0 г белка, 2.0 г жира, 25.0 г углеводов. Калорийность составляет 143 ккал. В условиях гиперкалорийной диеты суточная калорийность превышала

нормативную на 30% в течение 14 дней. Повышение калорийности пищи, избыток жиров и углеводов приводит к гипертрофии и гиперфункции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и гиперпродукции инсулина.

Для моделирования сахарного диабета использовались аллоксановая и стрептозоциновая модели.

При аллоксановой модели крысам однократно вводили аллоксана тетрагидрат в дозе 170 мг/кг массы тела. Контролем служили животные с однократным подкожным введением 0,9% раствора хлорида натрия. Через 7 дней после развития диабета в течение 14 дней проводился прием природной артезианской необработанной и обработанной воды со степенью минерализации 0,8 г/л. При проведении опытов соблюдали положения Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Экспериментальный стрептозоциновый диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением крысам раствора стрептозоцина в 0,4 мл цитратного буфера в дозе 50 мг/кг массы тела после 18-часового голодания.

Состояние животных оценивали визуально, фиксировали летальность в группах, изменение массы тела животных, потребление корма и воды, поведенческую активность. Для установления диабетического статуса по ходу эксперимента осуществляли контроль концентрации глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, взятой из хвостового надреза крыс с помощью анализатора Nycocard II. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6.1 фирмы StatSoft.

В эксперименте животным предлагалась (*ad libitum*) артезианская среднеминеральная вода (pH= 7,5), пересыщенная воздухом. Пересыщение составляло порядка 3,5-4 раз. Размеры нанопузырьков – 250-300 нм, величины дзета-потенциалов нанопузырьков 10-40 мВ.

## Результаты и обсуждение

Показатели углеводного обмена у крыс при гиперкалорийной диете. Ожирение или избыточная масса тела являются факторами риска развития диабета. Во всех странах мира неуклонно растет количество пациентов с сахарным диабетом и этот процесс идет параллельно с ростом избыточной массы тела и ожирения среди населения. Ожирение вызывает серьезные метаболические нарушения в организме и предрасполагает к развитию сахарного диабета 2 типа.

В таблице 1 приведены показатели содержания гемоглобина и холестерина у крыс, содержащихся на гиперкалорийной диете. Видно, что вес крыс, принимающих гиперкалорийное питание, увеличился более, чем в 2 раза (на 112%) за две недели. Повышение веса сопровождалось повышением гликозилированного гемоглобина на 12,5% по сравнению с контрольной группой. Содержание холестерина в сыворотке и плазме практически не изменилось.

У крыс на гиперкалорийной диете прием воды с нанопузырьками привел к достоверному повышению веса на 70%, а при приеме исходной воды – на 112%, т.е. при приеме обработанной воды повышение веса сохраняется,

**Таблица 1. Вес и биохимические показатели крови крыс, в условиях гиперкалорийной диеты**

Группа крыс	Вес, прирост в %	GHbA	Холестерин сыворотки
Контроль	34,146	4,08	4,32
Диета+исходная вода	72,42 p=0,0162	4,56 p=0,0106	4,25 p=0,327
Диета+вода с нанопузырьками	59,29 p=0,0472	4,10 p=0,654	3,8 p=0,028

Примечание: GHbA – гликозилированный гемоглобин; показатели веса: величина p между группами крыс на диете равна 0,117; показатель GHbA: между группами крыс на диете p=0,009

**Таблица 2. Влияние обработанной воды на биохимические показатели крови крыс с экспериментальным стрептозоциновым диабетом**

Показатель	Исходные показатели	Группы крыс с экспериментальным диабетом							
		Группа контроля, день				Группа приема воды с нанопузырьками, день			
		7	14	21	28	7	14	21	28
Глюкоза ммоль/л	5,7±0,3	18,1±0,36	21,4±0,46	22,0±0,32	20,7±0,40	19,0±0,37	20,9±0,28	19,9±0,3* p<0,05	18,4±0,26* p<0,05
Гликозилированный гемоглобин, %	4,95±0,39	6,60±0,20	6,90±0,30	6,90±0,22	7,10±0,20	6,70±0,19	6,90±0,24	6,40±0,20	6,40±0,18

\* – различия достоверны в сравнении с соответствующим днем контроля

но гораздо менее выражено, чем при приеме необработанной артезианской воды. У крыс, принимающих воду с нанопузырьками величина GHbA не изменилась по сравнению с контрольной группой, а холестерин сыворотки и плазмы оказался ниже по сравнению с контролем.

Содержание глюкозы может повышаться вследствие стрессового состояния крыс, поэтому в таблице не приведено.

Влияние воды с нанопузырьками на крыс с экспериментальным диабетом. Для экспериментального моделирования гипергликемии, обусловленной абсолютной недостаточностью инсулина в организме, и других нарушений метаболизма, характерных для сахарного диабета 1 типа, наиболее часто используют разрушение β-клеток островков Лангерганса такими химическими соединениями, как аллоксан и стрептозоцин.

Аллоксан (уреид мезоксалево́й кислоты) и стрептозоцин (антибиотик широкого спектра действия) представляют собой структурные аналоги глюкозы, за счет чего они связываются с транспортером глюкозы GLUT2 и избирательно накапливаются в β-клетках поджелудочной железы экспериментальных животных. Основным механизмом деструктивного действия аллоксана является генерация в циклической реакции с диалуроновой кислотой активных форм кислорода, которые инициируют разрушение β-клеток, имеющих низкую антиоксидантную защиту [28]. Поражение β-клеток стрептозоцином обусловлено алкилированием ДНК с последующей активацией поли-АДФ-рибозосинтетазы, истощением клеточного пула NAD, что приводит в конечном итоге к некрозу клеток [29].

Разрушение β-клеток этими соединениями вызывает снижение синтеза и секреции в кровь инсулина, в

результате чего у животных развиваются гипергликемия и диабетический синдром, аналогичный инсулинозависимому сахарному диабету [30].

Аллоксановая или стрептозоциновая модели обычно используют для изучения эффектов проводимой терапии на относительно ранних сроках развития клинических проявлений сахарного диабета на 7-10 сутки.

Стрептозоциновая модель сахарного диабета. Через 7 дней после введения стрептозоцина визуальный осмотр животных показал, что у крыс второй группы снизилась двигательная активность, отсутствовал груминг, повысилась потребность в воде. Животные заметно похудели, шерсть поредела, их общее состояние оценивалось как тяжелое. Состояние животных контрольной группы не изменилось.

Через 14 дней приема обработанной воды состояние крыс с экспериментальным диабетом улучшилось. Уменьшилось выпадение шерсти, повысилась двигательная активность, появился груминг.

Через 21 и 28 дней состояние крыс, принимающих обработанную воду, продолжило улучшаться.

Содержание глюкозы в крови крыс, принимающих обработанную воду, ниже, чем у крыс, принимающих обычную воду. Различия невелики и в обоих случаях на 14 день эти значения далеки от исходных до диабета значений. На 28 день у крыс с диабетом содержание глюкозы уменьшилось, однако по-прежнему намного выше, чем у здоровых крыс (табл.2).

У крыс со стрептозоциновым диабетом при приеме обработанной воды наблюдается тенденция к уменьшению содержания гликозилированного гемоглобина, однако даже на 28 день это показатель остается высоким.

Аллоксановая модель сахарного диабета. Через 7

Таблица 3. Влияние обработанной воды на биохимические показатели крови крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом

Показатель	Исходные показатели	Группы крыс с экспериментальным диабетом	
		Группа контроля, 14 день	Группа приема воды с нанопузырьками, 14 день
Глюкоза, ммоль/л	5,7 ± 0,3	17,4 ± 1,2	14,1 ± 0,9* (p<0,05)
Гликозилированный гемоглобин, %	4,95 ± 0,39	5,8 ± 0,48	4,8 ± 0,23

\* – различия достоверны в сравнении с контролем

дней после введения аллоксана визуальный осмотр животных показал, что у крыс второй группы снизилась двигательная активность, отсутствовал груминг, повысилась потребность в воде. Животные заметно похудели, шерсть поредела, их общее состояние оценивалось как тяжелое. Состояние животных контрольной группы не изменилось.

Через 14 дней приема обработанной воды состояние крыс с аллоксановым диабетом улучшилось. Уменьшилось выпадение шерсти, повысилась двигательная активность, появился груминг.

## Заключение

Наблюдается благоприятное действие воды с нанопузырьковой фазой воздуха на крыс в условиях гиперкалорийной диеты и с экспериментальным аллоксановым и стрептозоциновым диабетом.

В условиях гиперкалорийной диеты: повышение веса у крыс ниже на 60% по сравнению с группой, не принимающей обработанную воду; величина гликозилированного гемоглобина не изменилась по сравнению с контрольной группой, а холестерин сыворотки и плазмы оказался ниже по сравнению с контролем; достоверно снижается уровень глюкозы у мышей на 6%.

Как в случае аллоксановой, так и в случае стрептозоциновой моделями диабета, прием обработанной воды крысами в отсутствие сахароснижающей терапии приводит к понижению уровней глюкозы и гликозилированного гемоглобина. Эффект от приема воды в большей степени проявляется на крысах с аллоксановым диабетом. Причины различий кроются в различном механизме действия аллоксана и стрептозоцина. Основным механизмом действия аллоксана является генерация в циклической реакции с диалуроновой кислотой активных форм кислорода, которые инициируют разрушение  $\beta$ -клеток, имеющих низкую антиоксидантную защиту [30]. Можно предположить, что положительное действие нанопузырь-

ковой воды связано с проявлением ею антиоксидантных свойств.

Оба вида диабета (аллоксановый и стрептозоциновый) связаны с деструктивным действием веществ на клетки поджелудочной железы, обеспечивающих выработку инсулина, а следовательно, имеют четкую морфологическую основу, лежащую в патогенезе модели. С нашей точки зрения, важным является тот факт, что у крыс, находящихся на несбалансированном рационе питания, включающем избыток жиров и углеводов, употребление воды с нанопузырьковой фазой сохраняет баланс в отношении показателей гликозилированного гемоглобина, способствует снижению веса и количества холестерина в сыворотке. Гиперкалорийная диета приводит к гиперпанкреатизму [31], разрушения инсулинпродуцирующих клеток не выявляется, а следовательно, это состояние, которое можно корректировать в процессе его развития.

Механизм действия воды с нанопузырьковой фазой требует дальнейших исследований, тем не менее, можно сделать заключение о том, что прием воды с нанопузырьками воздуха приводит к повышению антиоксидантной защиты клеток. Возможно, двойной электрический слой принимают участие в окислительно-восстановительных процессах подобно веществам-антиоксидантам. Необходимо также выяснение роли природы газа нанопузырьковой фазы в обнаруженных эффектах. ■

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект p\_a № 16-43-180106.*

**Бутолин Е.Г., Данилова О.В., Канунникова О.М., Чучкова Н.Н., Сметанина М.В., Кожевников В.И., Трубочев А.В.,** ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (ФГБОУ ВО ИГМА МЗ РФ), ФГБУН Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН (Уд-мФИЦ УрО РАН), 426067, Ижевск, РФ

## Литература:

1. Andre I., Gonzalez A., Wang B. Checkpoints in the progression of auto-immune disease: lessons from diabetes models. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 2260-2263.
2. Bayens J.W., Thorpe S.R. Oxidative stress in diabetes.

- Antioxidants in Diabetes Management. Ed. Packer. New York: M. Dekker Inc. 2000; 58-66.*
3. Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.*
  1. *Nature.* 2001; 414: 813-820.
  4. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd ed. New York: Oxford University Press. 1999: 20-37.
  5. Cooper M.E., El-Osta A., Allen T.J., Watson A.M.D., Thomas M.C., Jandeleit-Dahm K.A.M. *Metabolic karma-the atherogenic legacy of diabetes. The 2017 Edwin Bierman Award Lecture. Diabetes.* 2018; 67(5):785-790.
  6. Zhou X., Dong J., Zhang L., Liu J., Dong X., Yang Q. *et al. Hyperglycemia has no effect on development of restenosis after percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in a diabetic rabbit model. J Endocrinol.* 2015; 224(2):119-125.
  7. Feillet-Coudray C., Rock E., Coudray C., Grzelkowska K., Azais-Braesco V., Dardevet D. *et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. Clin Chim Acta.* 1999; 284:31-43.
  8. Vural P., Kabaca G., Firat R.D., Degirmencioglu S. *Administration of selenium decreases lipid peroxidation and increases vascular endothelial growth factor in streptozotocin induced diabetes mellitus. Cell J.* 2017; 19(3):452-460.
  9. West I.C. *Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabet Med.* 2000;17:171-180.
  10. Rosen P., Nawroth P., King G. *The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and complications. Diabetes Metab Res.* 2001; 17:189-212.
  11. Mahesh T., Menon V.P. *Quercetin alleviates oxidative stress instreptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res.* 2004;18:123-127;
  12. Young I.S., Torney J.J., Trimble E.R. *The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. Free Radic Biol Med.* 1992;13:41-46.
  13. Suhail M., Patil S., Khan S., Siddiqui S. *Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant, and gestational diabetic women: erythrocytes osmotic fragility profiles. J Clin Med Res.* 2010; 2:266-273.
  14. Shidfar F., Homayounfar R., Fereshtehnejad S.M., Kalani A. *Effect of folate supplementation on serum homocysteine and plasma total antioxidant capacity in hypercholesterolemic adults under lovastatin treatment: a double-blind randomized controlled clinical trial. Arch Med Res.* 2009; 40:380-386.
  15. Roussel A.M., Kerkeni A., Zouari N., Mahjoub S., Matheau J.M., Anderson R.A. *Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. J Am Coll Nutr.* 2003; 22:316-321.
  16. Hamdiken M., Bouhalit S., Kechrid Z. *Effect of ruta chalepensis on zinc, lipid profile and antioxidant levels in the blood and tissue of streptozotocin-induced diabetes in rats fed zinc-deficient diets. Can J Diabetes.* 2017; pii: S1499-2671(17): 30078-30083.
  17. Melo da Cunha J.D.S., Alfredo T.M., Dos Santos J.M., Abves Junior V.V., Rabelo L.A., Lima E.S. *et al. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidiabetic activity of Apis mellifera bee tea. PLoS One.* 2018; 13(6):e0197071.
  18. Yu Y.M., Chang W.C., Chang C.T., Hsieh C.L., Tsai C.E. *Effects of young barley leaf extract and antioxidative vitamins on LDL oxidation and free radical scavenging activities in type 2 diabetes. Diabetes Metab.* 2002; 28:107-114.
  19. Kim H.Y., Jeon E.J., Park Y.K., Kang M.H. *Effect of deer antler drink supplementation on blood pressure, blood glucose and lymphocyte DNA damage in type 2 diabetic patients. Korean J Nutr.* 2004; 37:794-800.
  20. Lee S.H., Lee H.J., Lee Y.H., Lee B.W., Cha B.S., Kang E.S. *et al. Korean red ginseng (Panax ginseng) improves insulin sensitivity in high fat fed Sprague-Dawley rats. Phytother Res.* 2012; 26:142-147.
  21. Hininger-Favier I., Benaraba R., Coves S., Anderson R.A., Roussel A.M. *Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance, the fructose-fed rat. J Am Coll Nutr.* 2009; 28:355-361.
  22. Escudero-López B., Ortega Á., Cerrillo I., Rodríguez-Griñolo M.R., Muñoz-Hernández R., Macher H.C. *et al. Consumption of orange fermented beverage improves antioxidant status and reduces peroxidation lipid and inflammatory markers in healthy humans. J Sci Food Agric.* 2018; 98(7):2777-2786. .
  23. Bonamigo T., Campos J.F., Oliveira A.S., Torquato H.F.V., Balestieri J.B.P., Cardoso C.A.L. *et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of Plebeia droryana and Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. PLoS One.* 2017; 12(9):e0183983.
  24. Ha B.G., Moon D.S., Kim H.J., Shon Y.H. *Magnesium and calcium-enriched deep-sea water promotes mitochondrial biogenesis by AMPK-activated signals pathway in 3T3-L1 preadipocytes. Biomed Pharmacother.* 2016; 83:477-484.
  25. Naumann J., Biehler D., Lüty T., Sadaghiani C. *Prevention and therapy of type 2 diabetes-what is the potential of daily water intake and its mineral nutrients? Nutrients.* 2017; 9(8): pii: E914.
  26. Hye-Jin Lee, Myung-Hee Kang. *Effect of the magnetized water supplementation on blood glucose, lymphocyte DNA damage, antioxidant status, and lipid profiles in STZ-induced rats. Nutr Res Pract,* 2013; 7(1):34-42.
  27. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е издание, переработанное и дополненное. Киев: Вища школа. Головное изд-во; 1983.*
  28. Балаболкин М.И. *Диабетология. М.: Медицина; 2000.*
  29. Szkudelski T. *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Diabetologia.* 2001; 50(6):536-546.
  30. Lenzen S. *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia.* 2008; 51:216 – 226.
  31. Николаева О. В., Ковальцова М. В., Татарко С. В., Литвиненко Е. Ю. *Влияние не сбалансированного питания с повышенным содержанием углеводов и жиров на морфофункциональное состояние поджелудочной железы беременных крыс и их потомства. Вестник проблем биологии и медицины.* 2014; 3(2):109.