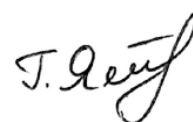


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

ГАЧКОВА ГАЛИНА ЯРОСЛАВІВНА



УДК 577.2:[616.379-008.64:[577.15/.18:633.88]-043.2]

**МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ АНТИДІАБЕТИЧНОЇ ДІЇ БІОЛОГІЧНО
АКТИВНИХ РЕЧОВИН, ВИДІЛЕНИХ З ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН
GALEGA OFFICINALIS L. ТА *SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*
(*POEPP. ET ENDL.*) Н. ROBINSON**

03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія

Реферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Львів 2024

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка

Науковий консультант: докторка біологічних наук, професорка
Сибірна Наталія Олександрівна
Львівський національний університет
імені Івана Франка,
завідувачка кафедри біохімії

Офіційні опоненти: докторка біологічних наук, професорка,
член-кореспондентка НАН України
Ємець Алла Іванівна
Державна установа “Інститут харчової біотехнології та
геноміки НАН України”,
завідувачка відділу клітинної біології і біотехнології

докторка біологічних наук, професорка,
Столяр Оксана Борисівна
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка,
професорка кафедри хімії та методики її навчання

докторка біологічних наук, професорка,
Кобилінська Леся Іванівна
Львівський національний медичний університет імені
Данила Галицького,
завідувачка кафедри біологічної хімії

Захист відбудеться “06” лютого 2024 р. о 14⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.246.01 Інституту біології клітини НАН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16. Тел: (032) 261 21 44

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біології клітини НАН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16 та на сайті <https://www.cellbiol.lviv.ua/index.php?do=cat&category=ukr-council>

Автореферат розіслано “05” січня 2024 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради,
к. б. н., н. с.



Наталія ФІНЮК

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Цукровий діабет (ЦД) є однією з головних проблем медицини у світі, зважаючи на швидкі темпи поширення захворювання та серйозні ускладнення (ангіо-, нефро- та нейропатії). Значні економічні витрати зумовлені стрімким зростанням поширеності ЦД і передчасною втратою працездатності, а також рання смертність людей унаслідок ускладнень, зумовлюють необхідність удосконалення способів лікування цього захворювання та пошук нових ефективних антидіабетичних препаратів.

Хронічна гіперглікемія призводить до підвищеного утворення активних форм Оксигену і Нітрогену (АФО і АФН), накопичення кінцевих продуктів глікації (AGEs) й активації відповідних рецепторів (RAGEs), а також стимулює низку стрес-залежних сигнальних каскадів (NF- κ B, кіназ p38 MAPK та JNK), які залучені до ушкодження клітин та розвитку ускладнень ЦД [Evans et al., 2005; Yaribeygi et al., 2020].

Гіперглікемія викликає перехід лейкоцитів у преактивований стан. Преактивація лейкоцитів пов'язана зі структурно-функціональною перебудовою рецепторного апарату цих клітин, яка найчастіше зумовлена змінами структури сіаловмісних вуглеводних детермінант поверхневих глікопротеїнів. Такі структурні модифікації впливають на трансдукцію зовнішніх сигналів, які проводяться по сигнальних мережах клітини і задіяні у регуляції процесів перебудови мікрофіламентів цитоскелету. Реорганізація актинового цитоскелету відіграє ключову роль у забезпеченні хемотаксису лейкоцитів, утворення фагосом і фаголізосом, процесу дегрануляції нейтрофілів, формування повноцінної NADPH-оксидазної системи і утворення АФО, що є важливим для здійснення ефективного імунного захисту [Aslan, 2012; Clements, 2003; Bugyi B. et al., 2010; Mastrogiorganni et al., 2020; Pollard T., 2007; Samstag Y. et al., 2003; Marelli-Berg & Jangani, 2018; Vicente-Manzanares & Sánchez-Madrid, 2004].

З огляду на багатофакторну етіологію, лікування ЦД та його ускладнень вимагає багатоцільових підходів, одним з яких є комплексна терапія, яка поєднує синтетичні пероральні антидіабетичні препарати та фітопрепарати [Rasouli et al., 2020]. Завдяки багатокомпонентному складу, комплекси біологічно активних речовин лікарських рослин не лише забезпечуватимуть глікемічний контроль, а й протидіятимуть іншим факторам ризику, які виникають при діабеті. До того ж, аддитивна дія та синергізм фітокомпонентів зумовлюють виражений антидіабетичний ефект, який важко відтворити застосовуючи лікарські монопрепарати. Фітопрепарати зумовлюють значно менше негативних побічних ефектів, порівняно з синтетичними пероральними засобами. Застосування фітопрепаратів у комплексній терапії ЦД сприятиме зниженню дози синтетичних антидіабетичних засобів та зменшенню побічних ефектів, що є надзвичайно важливо, зважаючи на хронічний перебіг захворювання.

Цікавою лікарською рослиною, яка може слугувати основою для створення нових антидіабетичних препаратів і функціональних харчових продуктів природного походження є *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський). Ранні фармакологічні дослідження показали, що надземна частина цієї рослини містить біологічно активні речовини (БАР) з гіпоглікемічною дією, яку пояснювали наявністю в складі сировини алкалоїдів – галегіну та гідроксигалегіну (Susag et al., 2003). Галегін став основою для синтезу метформіну, який використовують як препарат першої лінії у моно- та комбінованій терапії ЦД 2 типу (Park et al., 2013). Проте, алкалоїди є токсичними сполуками, що створює труднощі у застосуванні цієї рослини у терапевтичних кількостях. Незважаючи на те, що лікувальні властивості *G. officinalis* вже давно визнані та оцінені в традиційній медицині, вивченню фітохімічного профілю та поясненню механізмів дії фітокомпонентів *G. officinalis* приділено недостатньо уваги.

Ще однією рослиною, із вираженою гіпоглікемічною дією є *Smallanthus sonchifolius* (якон). Кореневі бульби *S. sonchifolius* є багатим джерелом β -(2 $\rightarrow$ 1)-фруктоолігосахаридів (олігофруктани інулінового типу), які сповільнюють всмоктування моносахаридів у ШКТ [Simonovska et al., 2003]. Листя *S. sonchifolius* містить сполуки фенольної природи, які є однією з найважливіших груп природних антиоксидантів [Cao et al., 2018; Lachman et al., 2003a; Rajchl et al., 2018; Simonovska et al., 2003; Valentova et al., 2016; Honore & Genta, 2015; Valentova et al., 2016].

Фітокомпоненти цих рослин виявляють гіпоглікемічний ефект, проте механізми антидіабетичної дії залишаються нез'ясованими. Дослідження молекулярно-клітинних механізмів дії біологічно активних речовин, виділених з *G. officinalis* та *S. sonchifolius* дасть змогу оцінити перспективи використання цих лікарських рослин як основи для створення антидіабетичних фітопрепаратів та функціональних харчових продуктів природного походження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за темами: “Розробка цукрознижувальних препаратів на основі біологічно активних речовин окремих лікарських рослин” (№ держреєстрації 0110U003147); “Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської” (№ держреєстрації 0110U003147); “Створення і дослідження біологічного впливу функціонального продукту харчування на основі фітопрепаратів, що мають антиоксидантну та цукрознижувальну дію” (№ держреєстрації 0116U001674); “Дослідження дії біологічно активних речовин природного походження з метою корекції патологій, що супроводжуються гіперглікемією” (№ держреєстрації 0116U001674). Робота також була виконана в рамках гранту від Державного фонду фундаментальних досліджень “Молекулярні механізми антидіабетичної дії препаратів рослинного походження” (№ держреєстрації 0113U005313) та за фінансової підтримки Західно-Українського центру біомедичних досліджень (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC) “The study of molecular mechanisms of leukocytes structural and functional state changes under the conditions of experimental diabetes mellitus type 1 and its correction by admission of *Galega officinalis* extract”.

Мета та завдання досліджень. Метою даної роботи було з'ясувати молекулярно-клітинні механізми коригуючого впливу біологічно активних речовин *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський) та *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (якон) на метаболічні, структурні і функціональні порушення при ЦД для обґрунтування їхнього застосування як засобів допоміжної терапії для зміцнення імунного статусу хворих на ЦД та розробки нових препаратів природного походження з антидіабетичною дією.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Розробити спосіб отримання та стабілізації безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* і суспензій корневих бульб *S. sonchifolius* застосовуючи екстрацелюлярні поверхнево-активні речовини рамноліпідної природи, що синтезуються штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 (біосурфактант PS-17) та дослідити компонентний склад стабілізованих фітопрепаратів.
2. Дослідити гіпоглікемічний ефект безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстрактів листя і суспензій корневих бульб *S. sonchifolius* за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД).
3. Вивчити вплив комплексу біологічно активних речовин, виділених з *G. officinalis* на структурно-функціональний стан клітин підшлункової залози за умов цукрового діабету.
4. З'ясувати антиоксидантний ефект досліджуваних речовин природного походження умов *in vitro* та *in vivo* (у нормі та за умов ЕЦД).

5. Оцінити функціональний стан лейкоцитів за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за:
 - вмістом кінцевих продуктів глікації і рівня експонованих на мембрані рецепторів до кінцевих продуктів глікації (RAGE);
 - кількісними і структурними змінами вуглеводних детермінант мембран лейкоцитів;
 - особливостями полімеризації-деполімеризації актину в процесі реалізації міграційної здатності цих клітин.
6. Дослідити вплив комплексів біологічно активних речовин, виділених з безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та *S. sonchifolius*, на функціонально пов'язані процеси неспецифічної ланки клітинного імунітету – фагоцитоз та продукцію бактерицидних біооксидантів за умов цукрового діабету.
7. Дослідити антиапоптичний потенціал екстрактів і суспензій *G. officinalis* та *S. sonchifolius* та їхній вплив на проліферацію лейкоцитів за умов цукрового діабету.
8. Оцінити мембраностабілізуючу дію та коригуючий ефект речовин природного походження, що містяться у складі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* на глікановий профіль мембран еритроцитів за умов ЕЦД.

Об'єкт дослідження – вплив біологічно активних речовин, виділених з *G. officinalis* та *S. sonchifolius* на біохімічні процеси, що опосередковують морфологічні та функціональні зміни клітин системи крові та β -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози за умов ЕЦД.

Предмет дослідження – біологічні ефекти (гіпоглікемічний, антиоксидантний та імуномодуючий) екстракту *G. officinalis*, позбавленого алкалоїдів та екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій корневих бульб *S. sonchifolius*.

Методи дослідження: методи клітинної біології (світлова та флюоресцентна мікроскопія, виділення лейкоцитів та клітин кісткового мозку, імуноцитохімічний аналіз, проточна цитофлюориметрія), аналітичні (газова хромато-мас-спектрометрія, високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометрією), біохімічні (спектрофотометричне визначення концентрації метаболітів та активності ензимів, імуноензимний аналіз, лектино-ензимний аналіз), фізико-хімічні (електрофорез протеїнів за денатуруючих умов, Вестерн-блот аналіз).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено способи отримання та стабілізації позбавленого від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* та суспензії порошку корневих бульб *S. sonchifolius* за допомогою біосурфактанту PS-17. На даний час немає подібних, стабілізованих біосурфактантами лікарських засобів, які б застосовувалися при лікуванні ЦД чи інших захворювань.

За допомогою методу газової хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад позбавленого від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* та ідентифіковано 27 сполук, а саме: вищі жирні кислоти та їхні естери, фітостероли, ди- та тритерпени, флавоноїди, фенольні кислоти та вітамін Е. За допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії, поєднаної з мас-спектрометрією, у складі позбавленого від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* було ідентифіковано 16 сполук фенольної природи, а саме фенольні кислоти, флавоноїди, антоціани та їхні похідні.

Вперше встановлено виражену гіпоглікемічну дію позбавленого від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг та підтверджено клітинний механізм відновлення функціонального стану β -клітин підшлункової залози при введенні цього екстракту тваринам з ЕЦД. Доведено дихотомію біологічного ефекту, зумовлену компонентним складом досліджуваних препаратів *S. sonchifolius* у дозі 500 мг/кг – біологічно активні речовини суспензій корневих бульб та екстракту листя *S. sonchifolius* найефективніше

покращують толерантність до глюкози, сповільнюючи всмоктування у ШКТ, і як наслідок, зумовлюють рівномірніше навантаження на інсулярний апарат, натомість екстракт кореневих бульб – базальний рівень глікемії, який оцінювали за вмістом глюкози і глікованого гемоглобіну. Найкраща гіпоглікемічна дія притаманна позбавленому від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* у стабілізованій формі за допомогою біосурфактанту PS-17.

Встановлено, що позбавлений від алкалоїдів екстракт *G. officinalis*, а також екстракти листя і суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* нівелюють прояви оксидативно-нітративного стресу за ЕЦД завдяки здатності сполук фенольної природи, які є у їхньому складі інактивувати вільні радикали та запобігати інгібуванню ключових ензимів антиоксидантної системи (АОС) – супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонпероксидази (ГПО). Найвираженішу антиоксидантну активність виявляють позбавлений від алкалоїдів екстракт *G. officinalis*, водний екстракт кореневих бульб та стабілізована суспензія кореневих бульб *S. sonchifolius* у дозі 500 мг/кг.

З'ясовано механізми зниження локомоторної функції лейкоцитів за умов ЕЦД на рівні реорганізації актинового цитоскелету, що зумовлює неефективну роботу імункомпетентних клітин крові і є основою незавершеного фагоцитозу та хронічного запалення. Корируюча дія позбавленого від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* на функціональний стан лейкоцитів реалізується шляхом впливу на процеси формування елементів актинового цитоскелету та завдяки кількісному перерозподілу глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант. Застосування суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* призводило до збільшення кількості експонованих на поверхні клітини залишків N-ацетилнейрамінової кислоти на фоні зменшення кількості експонованих залишків β -D-галактози. Нормалізація вмісту сіалових кислот у структурі глікокаліксу свідчить про відновлення функціональних властивостей цих клітин крові.

Показано, що інтенсифікація апоптозу лейкоцитів за досліджуваної патології є клітинним механізмом зниження кількості імункомпетентних клітин крові. Компенсаторною реакцією організму, що виникає у відповідь на зниження кількості лімфоцитів периферичної крові є посилення проліферативної активності кісткомозкових попередників цих клітин. Вперше встановлено здатність досліджуваних фітопрепаратів пригнічувати процес апоптозу лейкоцитів за ЦД. Найвищий антиапоптотичний потенціал виявляють позбавлений від алкалоїдів екстракт *G. officinalis*, водний екстракт листя та стабілізована суспензія кореневих бульб *S. sonchifolius*.

Застосування екстракту *G. officinalis* та екстракту і суспензії *S. sonchifolius* при досліджуваній патології нормалізує співвідношення різновікових популяцій еритроцитів та структуру глікокаліксу мембран еритроцитів завдяки посиленню сіалювання олігосахаридних ланцюгів та чинить мембраностабілізуючу дію. Найвираженіший протекторний ефект виявляють позбавлений від алкалоїдів екстракт *G. officinalis* та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius*.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено способи отримання седиментаційно стійких фітопрепаратів, а саме: екстракту *G. officinalis*, позбавленого від алкалоїдів та суспензії порошку кореневих бульб *S. sonchifolius*, стабілізованих за допомогою рамноліпідних біоПАР, що синтезуються штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 (сурфактант PS-17). Зазначені фітопрепарати можуть слугувати основою для створення комерційних антидіабетичних фітопрепаратів та функціональних харчових продуктів.

На розроблені способи отримання біологічно активних речовин з лікарських рослин *G. officinalis* і *S. sonchifolius* та їхньої стабілізації за допомогою біосурфактанту PS-17 отримано два патенти України на корисну модель (UA 96839, UA 101202 (2015)).

Комплексні дослідження біологічних ефектів фітокомпонентів *G. officinalis* і *S. sonchifolius* на структурно-функціональний стан острівцевого апарату підшлункової залози та клітини крові щурів за умов ЦД підтверджують їхню виражену антидіабетичну дію. Застосування безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* (у дозі 600 мг/кг) та екстрактів і суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* (у дозі 500 мг/кг) підвищує ефективність неспецифічних механізмів захисту організму, що у комплексі з гіпоглікемічною дією може перешкоджати розвитку і прогресуванню ускладнень ЦД.

Поєднання гіпоглікемічного, антиоксидантного, імуномодуючого ефектів безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстрактів і суспензій *S. sonchifolius*, а також їхня здатність відновлювати і підтримувати функціональний стан β -клітин підшлункової залози та клітин крові за умов ЦД свідчить про перспективність їхнього використання, як основи для створення комерційних фітопрепаратів з антидіабетичною дією.

У рамках договору про співпрацю між кафедрою біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка та Дослідною станцією лікарських рослин Інституту агроєкології і природокористування НААН України, на основі інтродукційних та фітохімічних досліджень було створено новий сорт козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) “Чародій” (частка участі дисертантки становить 25 % – аналіз компонентного складу).

Особистий внесок здобувача. Авторкою особисто проведено пошук та аналіз літератури, розроблено методологію експериментальних досліджень, сформульовано основні положення дисертації, здійснено підготовку рукопису. Експерименти виконані дисертанткою особисто або за безпосередньої участі. Планування роботи та обговорення частини отриманих результатів, підготовка деяких рукописів до публікації здійснювались спільно з науковим консультантом, професоркою Наталією Олександрівною Сибірною. Співучасть працівників кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка та вітчизняних і закордонних партнерів висвітлено у спільних публікаціях і зазначено в подяках.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на IX, X, XI, XVII, XVIII та XIX міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2013, 2014, 2015, 2021, 2022, 2023); Polish-Ukrainian Weigl Conference „From microbiology to synthetic biology” (Wrocław, 2011); науково-практичній конференції “Біохімічні основи патогенезу уражень внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції” (Тернопіль, 2011); 3 і 5-му З’їздах Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, 2012; Одеса, 2016); VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); Міжнародній науковій конференції “Механізми функціонування фізіологічних систем” (Львів 2014); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); III, IV та VI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур” (Березоточча, 2019, 2020, 2023); науково-практичній on-line конференції з міжнародною участю “Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії” (Харків, 2021); шостій міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології” (Дніпро, 2022).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано **61** наукову працю, включаючи **25** статей у фахових виданнях (**6** – у закордонних та **19** – у вітчизняних виданнях), з них **2** статі у виданнях, віднесених до першого і другого кварталів (**Q1 і Q2**) та **2** статті – у

журналах четвертого квартилю (**Q4**) відповідно до класифікації Scimago Journal and Country Rank, **1** розділ монографії (у закордонному виданні), **2** патенти України на корисну модель, **33** тез доповідей у матеріалах конференцій та з'їздів. Сумарний імпаکت-фактор публікацій за темою дисертації – **8,94**.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел (311 найменувань). Дисертація викладена на 294 сторінках і проілюстрована 60 рисунками та 27 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасні уявлення про механізми, які залучені у розвитку дисфункції β -клітин підшлункової залози при ЦД, а саме розглянуто роль стресу ендоплазматичного ретикулуму, мітохондріальної дисфункції та оксидативно-нітративного стресу. Охарактеризовано роль лейкоцитів у етіопатогенезі цукрового діабету 1 типу. Значну увагу приділено аналізу механізмів антидіабетичної дії біологічно активних речовин лікарських рослин, зокрема, *G. officinalis* та *S. sonchifolius*, як потенційних джерел фітокомпонентів з антидіабетичною дією.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження були проведені на білих безпородних щурах віком 4–5 місяців, з масою тіла 110–150 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з дотриманням загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах згідно з „Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом з біоетики [Київ, Україна, 2001] і погодженими з положеннями „Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях” [Страсбург, Франція, 1985]. ЕЦД індукували внутрішньоочеревним введенням стрептозотоцину [Sigma, США] з розрахунку 5,5 мг (у 10 мМ цитратному буфері, рН 5,5) на 100 г маси тіла тварини. Розвиток ЕЦД контролювали за вмістом глюкози в крові, яку визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів “Філісіт-Діагностика”, Україна.

У роботі використовували лікарські рослини, а саме, *G. officinalis*, яку було інтродуковану у Ботанічному саду Львівського національного університету імені Івана Франка та Дослідній станції лікарських рослин Інституту агроєкології і природокористування Національної академії аграрних наук України та *S. sonchifolius*, яку було вирощено на території Київської області. З надземної частини *G. officinalis* отримували безалкалоїдний екстракт за розробленою нами і запатентованою схемою [Сибірня Н., 2015]. З листя і кореневих бульб *S. sonchifolius* отримували водні екстракти листя і кореневих бульб, а також суспензію на основі порошку кореневих бульб. Для підвищення седиментаційної стійкості екстракту *G. officinalis* та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* застосовували біогенні поверхнево активні речовини, які синтезуються штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України [Сибірня Н., та ін. 2015]. Через два тижні після індукції ЦД, тваринам раз на добу *per os* вводили досліджувані фітопрепарати в об'ємі 1 мл впродовж 14 діб. Тваринам контрольної групи впродовж 14 діб вводили воду в об'ємі 1 мл.

Для оцінки біологічної дії безалкалоїдної фракції екстракту *G. officinalis* тварин було поділено на 8 груп: *перша* – контроль; *друга і третя* – здорові тварини, яким вводили нестабілізований і стабілізований біосурфактантом PS-17 безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг, відповідно; *четверта* – здорові тварини, яким вводили стабілізований біосурфактантом PS-17 безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* у дозі 1200 мг/кг; *п'ята* – тварини

з ЕЦД; *шоста і сьома* – тварини з ЕЦД, яким вводили нестабілізований і стабілізований біосурфактантом PS-17 безалкалоїний екстракт *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг, відповідно; *восьма* – тварини з ЕЦД, яким вводили стабілізований біосурфактантом PS-17 безалкалоїний екстракт *G. officinalis* у дозі 1200 мг/кг. Надалі безалкалоїдну фракцію екстракту козлятника лікарського, стабілізовану біосурфактантом PS-17 скорочено позначали, як БФЕКЛ. Скорочене позначення використовували для у таблицях і на рисунках.

Для оцінки біологічної дії екстрактів і суспензій *S. sonchifollius* тварин було поділено на 14 груп: *перша* – контроль; *друга і третя* – здорові тварини, яким вводили екстракт листя (Ел) у дозах 70 мг/кг і 500 мг/кг, відповідно; *четверта і п'ята* – здорові тварини, яким вводили екстракт кореневих бульб (Ек) у дозах 70 мг/кг і 500 мг/кг, відповідно; *шоста і сьома* – здорові тварини, яким вводили нестабілізовану і стабілізовану біосурфактантом PS-17 суспензії кореневих бульб (Ск і Ск^{PS}, відповідно) у дозі 500 мг/кг; *восьма* – тварини з ЕЦД; *дев'ята і десята* – тварини з ЕЦД, яким вводили Ел у дозах 70 мг/кг і 500 мг/кг, відповідно; *одинадцята і дванадцята* – тварини з ЕЦД, яким вводили екстракт Ек у дозах 70 мг/кг і 500 мг/кг, відповідно; *тринадцята і чотирнадцята* – тварини з ЕЦД, яким вводили Ск і Ск^{PS} у дозі 500 мг/кг.

Компонентний склад безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* вивчали за допомогою методів газової хромато-мас-спектрометрії та вискоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією.

Глюкозотолерантний тест проводили вранці після 18-годинного голодування тварин. Розчин глюкози (1 г / кг маси тіла) натще вводили *per os*. Площу під глікемічними кривими розраховували за допомогою правила трапецій [Yeh S., 2002]. Вміст інсуліну, С-пептиду та ФНП- α у плазмі крові та проліферативну активність клітин білого ростка кісткового мозку визначали імуноензимним методом згідно інструкцій фірм-виробників застосовуючи стандартні набори ELISA (Sigma, США та Millipore, США). Гістологічне дослідження підшлункової залози здійснювали згідно методик [Williams M. A., 1977]. Дослідження препаратів підшлункової залози проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus CX-41, оснащеного цифровою фотокамерою Olympus (Японія). Морфометричний аналіз острівцевого апарату підшлункової залози проводили використовуючи комп'ютерну програму ImageJ (НИН, США). Вміст AGEs та RAGE у лейкоцитах визначали імуноцитохімічним методом [Беркало et al., 2003; Diamanti-Kandarakis et al., 2007; Kalousova et al., 2002]. Вміст AGEs у плазмі крові визначали за [Putta & Eswar, 2015].

Фракціонування та морфологічні дослідження клітин кісткового мозку та визначення концентрації глікованого гемоглобіну (HbA1c) виконували згідно з методами описаними [Сибірня Н. та ін., 1997, 2006].

Фракціонування еритроцитів у градієнті густини сахарози для отримання різновікових популяцій, визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика, кількості та добової продукції ретикулоцитів, вмісту глікованого гемоглобіну визначали за допомогою методів, описаних [Сибірня Н. та ін., 1997, 2006]. Агрегаційну здатність еритроцитів та лейкоцитів досліджували турбідиметричним методом за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації „LA 230” [Bulegenov & Balmukhanov, 1993]. Виділення мембран еритроцитів здійснювали за методом [Dodge G.T., 1963]. Вміст мембранозв'язаних сілових кислот визначали за методом [Warren L., 1959]. Концентрацію протеїну визначали спектрофотометрично за Lowry O.H. et al., 1951.

Лейкоцити виділяли у градієнті густини фікол-тріомбаст (1,076–1,078 г/см³) [Лаповець, 2004]. Продукцію АФО в лейкоцитах крові вимірювали використовуючи H2DCF DA (2',7'-дихлородигідрофлюоресцеїн діацетат) (Fluka, Німеччина), який після окиснення перетворювався

у флюоресціюючий H2DCF (2',7'-дихлорфлюоресцеїн). Активність антиоксидантних ензимів супероксиддисмутази СОД (КФ 1.15.1.1), каталази (КФ 1.11.1.6), глутатіонпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.9), вміст відновленого глутатіону й ТБК-позитивних продуктів визначали згідно методик [Сибірна та ін., 2006]. Вміст карбонільних груп протеїнів визначали за [Demkovych et al., 2017]. Антиоксидантну активність фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius in vitro* визначали використовуючи DPPH-, ATBS-, FRAPP-методи [Shahidi & Zhong, 2015; Yen & Chen, 1995; Benzie & Strain, 1996; Pellegrini et al., 1999]. Сумарну активність NO-синтази (КФ 1.14.13.39) та активність індуктибельної NO-синтази визначали модифікованим мікропланшетним методом [Dawson J. and Knowles R., 1998]. Вміст нітрит- та нітрат-аніонів визначали з використанням реактиву Гріса [Miranda K. et al., 2001].

Визначення вмісту полімеризованого актину здійснювали методом протокової цитометрії з використанням фалоїдину міченого TRITC [Burns S. et al., 2010]. Фракціонування лізатів лейкоцитів з метою розділення фракцій, що містять довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі філаменти та мономери актину здійснювали за модифікованою методикою [Kwiatkowska K., 2003]. Вестерн-блот аналіз проводили згідно стандартного протоколу [Towbin H. et al., 1992].

Детекцію вмісту про- (p53) та антиапоптичного (Bcl-2) протеїнів здійснювали непрямым імунопероксидазним методом [Беркало Л. та ін., 2003]. Дослідження кількості клітин з ранніми та пізніми ознаками апоптозу здійснювали методом протокової цитометрії застосовуючи подвійне флюоресцентне фарбування клітин анексином V міченим FITC та пропідій йодидом (PI). Спектрофотометричне визначення вмісту фрагментованої ДНК проводили методом описаним [Орлова Е.А. и др., 2001].

Фагоцитарну активність нейтрофілів визначали за допомогою тесту з дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* [Absolom, 1986; Stoika et al., 2001]. Активацію кисневозалежних механізмів бактерицидної дії нейтрофілів оцінювали за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) у двох варіантах – спонтанний та стимульований латексом [Стасенко, 2021; Merzbach & Obedeanu, 1975] та методом цитохімічної детекції мієлопероксидазної активності [Стасенко, 2021; Graham & Karnovsky, 1966]. Кисеньнезалежну бактерицидну активність оцінювали за допомогою цитохімічного виявлення лізосомальних катіонних протеїнів (КП) [Беркало et al., 2003].

При проведенні лектинензиматичного аналізу використовували біотинільзовані лектини з різною вуглеводозв'язувальною специфічністю: *Wheat germ agglutinin* (WGA) – лектин, специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну (β -DGlcNAc), *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) – афінний до послідовності NeuNAc(α 2 $\rightarrow$ 3)DGal, *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) – специфічний до послідовностей NeuNAc(α 2 $\rightarrow$ 6)DGal/DGalNAc, *Ricinus communis agglutinin* (RCA) – афінний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридних послідовностей DGal(β 1 $\rightarrow$ 3(4))DGlcNAc, які зазвичай зустрічаються у структурі N-гліканів, *Peanut agglutinin* (PNA) – специфічний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридної послідовності DGal(β 1 $\rightarrow$ 3)DGalNAc – так званого антигена Томсена – Фріденрайха, або Т-антигена (Лектинотест, Україна).

Статистичний аналіз результатів дослідження проводили з використанням t-критерію Стьюдента і критерію ANOVA (для непараметричних даних). Вірогідною вважали різницю при $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Розробка способів отримання стабільних фітопрепаратів на основі безалкалоїдної фракції екстракту *G. officinalis* та порошку кореневих бульб *S. sonhifolius* застосовуючи сурфактант PS-17

Використовуючи метод фракціонування екстракту *G. officinalis* з метою видалення токсичних алкалоїдів [Сибірн Н. та ін., 2015] було отримано фракцію, збагачену БАР з потенційною гіпоглікемічною та антиоксидантною дією, яка є нетоксичною у терапевтичних концентраціях.

Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* має в'язку мазеподібну консистенцію, темно-зелене забарвлення, приємний запах, гіркуватий присмак. Екстракт добре розчиняється у метиловому та етиловому спиртах, нерозчиний в олії. При розчиненні у воді утворює суспензію, яка після струшування зберігає однорідність не менше 60 хв. Сухий залишок становить $26,2 \pm 0,1$ %, а втрата в масі при висушуванні становить $5,1 \pm 0,03$ %. З метою стандартизації безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* визначали вміст поліфенолів у його складі, що становить $28,8 \pm 2,5$ мг ГК/г екстракту. Згідно з токсикологічною класифікацією речовин, безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* при пероральному введенні належить до V класу токсичності – практично нешкідливі речовини (ЛД₅₀ поза межами 5 г/кг маси тіла).

Розроблено способи стабілізації безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензії кореневих бульб *S. sonhifolius* за допомогою біосурфактанту PS-17, головними складовими компонентами якого є рафноліпіди. Нами було підібрано оптимальне співвідношення компонентів для утворення стійкої дрібнодисперсної емульсії на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, що становить 3,3 г/л біосурфактанту PS-17. При додаванні біосурфактанту PS-17 у концентрації 0,6 г/л отримували неоднорідну емульсію: краплі розміром до 1 мкм становили 30 %, розміром 5–10 мкм – 60 % та краплі розміром більше 20 мкм – 10 %. У разі збільшення концентрації біосурфактанту PS-17 до 2,0 та 3,3 г/л було отримано дрібнодисперсні емульсії (середній розмір крапель менше 1 мкм) кількість яких становила до 80 % (рис. 1). Такі емульсії є стійкими і не розшаровувалися більше 30 діб.

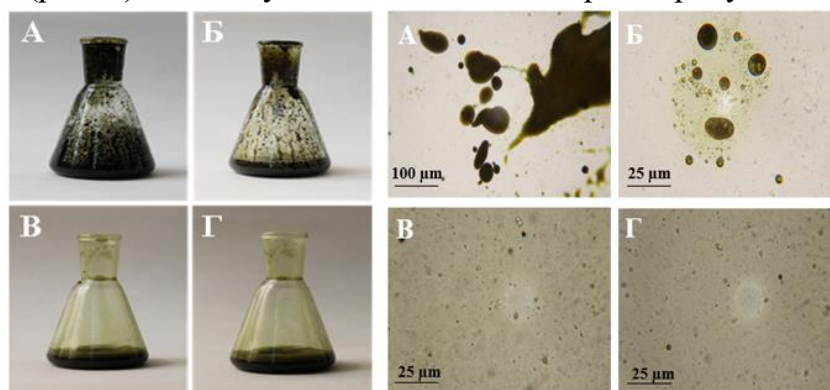


Рис. 1. Водна емульсія безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* (ліворуч) та мікрофотографії водної емульсії безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* (праворуч) стабілізовані біосурфактантом PS-17: А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л)

Седиментаційно стійкі суспензії на основі порошку кореневих бульб *S. sonhifolius* було отримано при додаванні біосурфактанту PS-17 (0,01 г/л) до водної суспензії (рис. 2), а також при попередній обробці порошку *S. sonhifolius* біосурфактантом PS-17, після чого, з нього була приготована водна суспензія. Обидва запропоновані способи дають змогу отримати водні суспензії, які є седиментаційно стабільними упродовж 15 хв.



Рис. 2. Водні суспензії порошку *S. sonchifolius* через 15 хв після приготування:

1 – контрольна суспензія;

2 – водна суспензія порошку якона, до якої додано біосурфактант PS-17 (0,01 мг / мл)

В результаті дослідження компонентного складу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за допомогою методу газової хромато-мас-спектрометрії було ідентифіковано 27 сполук, а саме: вищі жирні кислоти та їхні ефіри (63,9 %), монотерпен – лоліолід (1,4 %), дитерпени – неофітадієн (1,9 %) і фітол (3,7 %), тритерпени – сквален (0,3 %) і α -амірин (1,9 %), фітостероли – кампестерол (2,0 %), стигмастерол (14,7 %), флавоноїди (3,0 %) та вітамін Е (0,5 %).

Методом вискоєфективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією у складі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* було ідентифіковано 16 сполук фенольної природи. У негативному режимі електроспрей-іонізації у складі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* нами було виявлено три групи сполук фенольної природи: фенольні кислоти та їхні похідні (гексозид галової кислоти > п-гексозид гідробензойної кислоти > транс-корична > кислота п-кумарова кислота > ферулова кислота > саліцилова кислота > бензойна кислота), флавоноїди та їхні похідні (кверцетин-3-О-глюкозид > кверцитин-3-О-рамнозид > лютеолін > мірицитин > 3-О-глюкозид > хризин > апігенін) та антоціани (пеонідин-3-О-глюкозид).

Гіпоглікемічна дія водних екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* та безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Встановлено виражену гіпоглікемічну дію безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг маси тіла за ЦД, індукованого введенням стрептозотозину, про що свідчить зниження концентрації глюкози (на 63 %) й глікованого гемоглобіну (на 41 %) у крові та підвищення толерантності клітин до глюкози. Слід зазначити, що безалкалоїдна фракція екстракту *G. officinalis* виявляє гіпоглікемічні властивості лише за умов гіперглікемії. Суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* найефективніше знижують постпрандіальний рівень глікемії (про що свідчить зниження площі під глікемічними кривими), а екстракт кореневих бульб – базальний рівень глікемії, який оцінювали за вмістом глюкози і глікозильованого гемоглобіну. Порівняльний аналіз антидіабетичного ефекту фітопрепаратів на основі *S. sonchifolius* та *G. officinalis* дає підстави стверджувати, що найкраща гіпоглікемічна дія притаманна кореневим бульбам *S. sonchifolius* у формі стабілізованої суспензії, а також стабілізованому за допомогою біосурфактанту PS-17 безалкалоїдному екстракту *G. officinalis*.

Гіпоглікемічна дія водних екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* та безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* є дуже цінною під час розробки антидіабетичних препаратів, які запобігатимуть гіперглікемії як етіологічній причині розвитку хронічних ускладнень ЦД.

Вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на структурно-функціональний стан клітин острівцевого апарату підшлункової за умов ЕЦД

З метою обґрунтування механізмів гіпоглікемічної дії безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* було проведено морфометричне дослідження структури ендокринної частини підшлункової залози. За ЕЦД встановлено ураження інкреторного апарату підшлункової залози: знижується кількість панкреатичних острівців на стандартній одиниці площі (у 3,6 рази порівняно з контролем) та кількість β -клітин і їхніх секреторних гранул (рис. 3).

При введенні тваринам, хворим на ЦД безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг маси тіла виявлено незначне збільшення кількості островців Лангерганса, їхньої середньої площі, діаметру, об'єму та кількості β -клітин, порівняно з діабетом (рис. 3, Д). Натомість встановлено вираженішу цитопротекторну дію цього екстракту при введенні його у дозі 1200 мг/кг маси тіла, про що свідчить достовірне збільшення показника щільності розташування островців Лангерганса (на 72,2 %), їхніх індивідуальних показників – площі (на 55,8 %), діаметру (на 33,7 %) та об'єму (на 71,0 %), а також кількості β -клітин (на 39,0 %), порівняно з показниками у тварин з ЕЦД (рис. 3, Е).

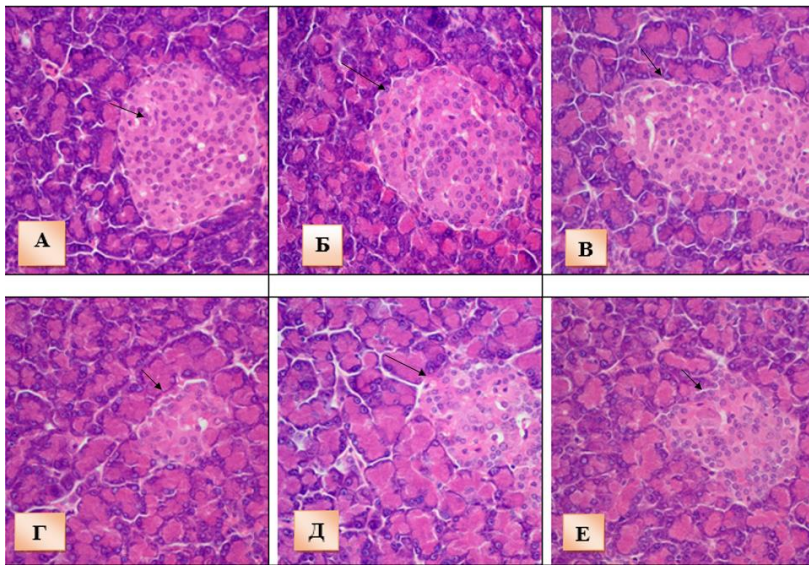


Рис. 3. Морфологічна структура підшлункової залози. Стрілками показано островці Лангерганса.

A – Контроль (К);
Б – К+БФЕКЛ (600 мг/кг);
В – К+БФЕКЛ (1200 мг/кг);
Г – ЕЦД;
Д – ЕЦД+БФЕКЛ (600 мг/кг);
Е – ЕЦД+БФЕКЛ (1200 мг/кг)
 Фарбування гематоксилін – еозином.
 Збільшення 40x10.

Протекторний вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на острівцевий апарат підшлункової залози у разі стрептозотоцин-індукованого діабету підтверджують дослідження вмісту маркерних показників, які характеризують функціональний стан β -клітин островців Лангерганса підшлункової залози (рис. 4).

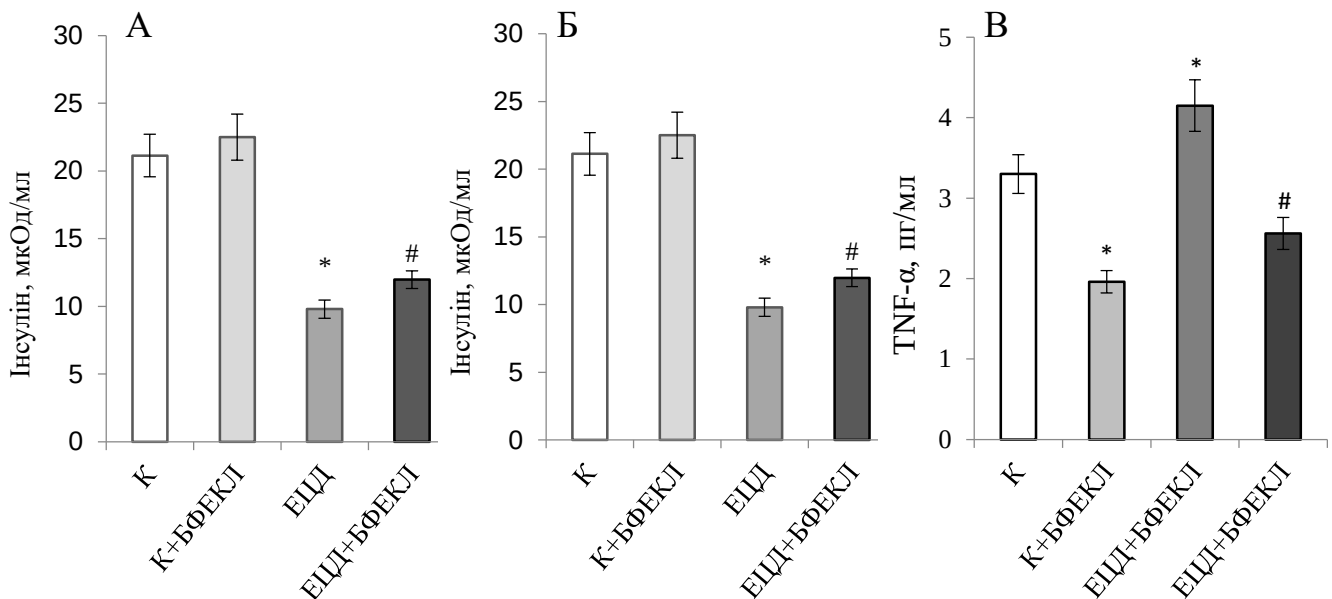


Рис. 4. Концентрація інсуліну (А), С-пептиду (Б) та TNF- α (В) у плазмі крові умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* (Примітка. Тут і далі: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$).

При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг маси тіла концентрація інсуліну та С-пептиду не змінювалася у тварин контрольної групи, натомість у тварин з ЕЦД підвищувалася (у 1,7 та 2,2 рази відповідно) щодо діабету (рис. 4, А-Б).

Зважаючи на те, що гомеостаз глюкози за ЦД може порушуватися не лише у разі дисфункції β -клітин підшлункової залози, але й при підвищенні вмісту прозапальних цитокінів у крові [Greenberg & McDaniel, 2002] нами було визначено вміст TNF- α у підшлунковій залозі піддослідних тварин. Розвиток ЕЦД супроводжувався підвищенням вмісту TNF- α . При введенні екстракту *G. officinalis* здоровим та хворим на діабет тваринам вміст цього цитокіну знижувався на 40 та 37 % відповідно (рис. 4, В).

Антиоксидантний потенціал біологічно активних речовин виділених з *G. officinalis* та *S. sonchifolius*

За здатністю нейтралізувати АФО та зв'язувати іони металів змінної валентності *in vitro* показано вищий антиоксидантний потенціал екстракту листя *S. sonchifolius*, порівняно з екстрактом *G. officinalis*, що зумовлено вищим вмістом у їхньому складі фенольних сполук (ФС) (табл. 1)

Таблиця 1

Вміст фенольних сполук та антиоксидантна активність безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстракту листя *S. sonchifolius*

Зразок	ФС, мг ГК/г	ТЕАС, мкмоль ТЕ/ г зразка		
		DPPH	ATBS	FRAPP
Екстракт <i>G. officinalis</i>	28,77 $\pm$ 2,47	56,72 $\pm$ 1,52	114,73 $\pm$ 5,95	150,56 $\pm$ 2,76
Екстракт листя <i>S. sonchifolius</i>	48,04 $\pm$ 3,89	195,13 $\pm$ 8,95	423,60 $\pm$ 33,26	238,33 $\pm$ 5,37

ТЕАС – еквівалентна тролоксу антиоксидантна здатність

Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* попереджає розвиток оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах за умов ЕЦД запобігаючи надмірному утворенню АФО (рис. 5), зумовлюючи зниження активності NO-синтази, вмісту стабільних метаболітів NO, продуктів ПОЛ та карбонільних груп протеїнів, а також сприяючи підвищенню активності ензимів АОС.

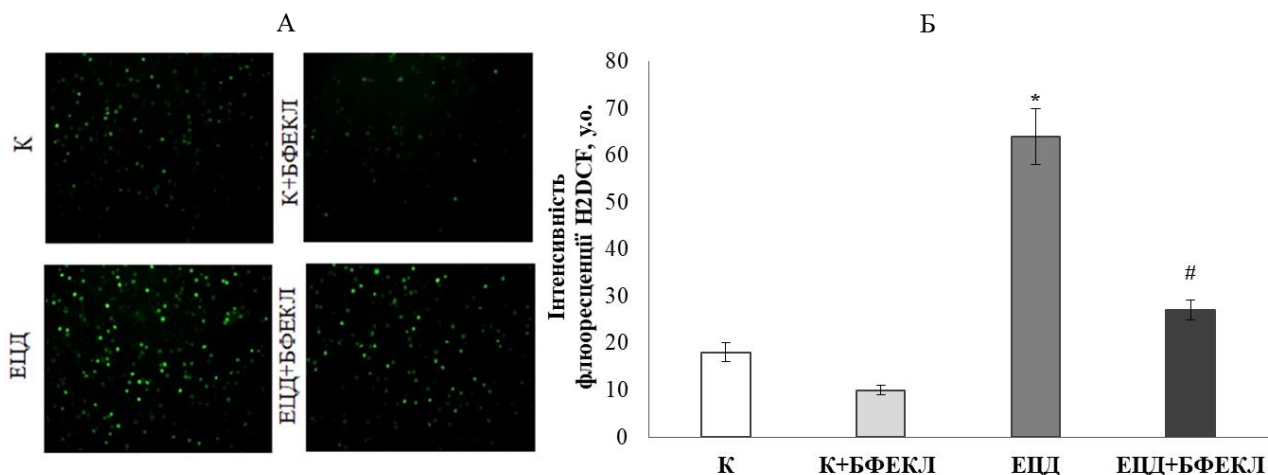


Рис. 5. А – Мікрофотографії лейкоцитів щурів (x40); Б – Оцифровані дані мікрофотографій, що відображають рівень АФО у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флюоресценції H2DCF

За результатами визначення маркерних показників оксидативно-нітративного стресу було виокремлено такі особливості антиоксидантного ефекту екстракту *G. officinalis* та екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* у клітинах крові та підшлункової залози за умов ЕЦД (рис. 5): 1) процеси ПОЛ активуються у більшій мірі, ніж процеси ОМП; 2) найвищий вміст окисномодифікованих протеїнів та ліпідів відмічено в еритроцитах, при цьому, активність ензимів АОС в еритроцитах пригнічується у більшій мірі, ніж у лейкоцитах; 3) компоненти екстракту *G. officinalis* ефективно знижують рівень АФО у лейкоцитах за умов ЕЦД – у 2,5 рази порівняно з діабетом (рис. 5), вміст стабільних метаболітів NO – нітрит- та нітрат-аніонів, вміст окисномодифікованих протеїнів, а також зумовлюють мобілізацію ензимів АОС – СОД і каталази; серед фітопрепаратів на основі *S. sonchifolius* найвираженішу антиоксидантну дію у лейкоцитах виявляє стабілізована суспензія кореневих бульб ($Ск^{PS}$) *S. sonchifolius*; 4) введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* пригнічує активність iNOS та знижує вміст нітрит- та нітрат-аніонів та продуктів ПОЛ, а також запобігає інгібуванню активності ГПО та зумовлює підвищення вмісту відновленого глутатіону у підшлунковій залозі; 5) в еритроцитах накопиченню продуктів ПОЛ та ОМП найефективніше запобігає екстракт *G. officinalis*, екстракт листя у дозі 500 мг/кг ($Ел^{500}$) та суспензії кореневих бульб ($Ск$ і $Ск^{PS}$); зростанню активності ензимів АОС в еритроцитах сприяють БАР у складі фітопрепаратів як на основі *G. officinalis*, так і *S. sonchifolius*.

Підшлункова залоза	Лейкоцити	Еритроцити
↓ активність iNOS ↓ вміст NO_3^- та NO_2^- ↓ вміст окисно-модифікованих ліпідів ↑ активність ензимів АОС (ГПО) ↑ вміст GSH	↓ вміст АФО (БФЕКЛ) ↓ активність сумарної NOS, вміст NO_3^- , NO_2^- (БФЕКЛ) ↓ вміст окисно-модифікованих ліпідів і протеїнів (БФЕКЛ , $Ел^{500}$, $Ск^{PS}$) ↑ активність ензимів АОС	↓ вміст окисно-модифікованих ліпідів і протеїнів БФЕКЛ, $Ел^{500}$, $Ск$, $Ск^{PS}$ ↑ активність ензимів АОС:
БФЕКЛ	СОД, КАТ БФЕКЛ ГПО $Ел^{500}$, $Ск^{PS}$	СОД – $Ел^{500}$, $Ск$, БФЕКЛ каталаза та ГПО $Ел^{500}$, $Ск^{PS}$, БФЕКЛ

Рис. 6. Антиоксидантний ефект біологічно активних речовин, виділених з *G. officinalis* та *S. sonchifolius*

Коригуючий ефект безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* на морфофункціональний стан еритроцитів за умов ЕЦД

Встановлено зниження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов стрептозотоцин-індукованого діабету, а саме швидке зростання максимальної кількості гемолізованих еритроцитів (на 2,1 хв) та швидкий гемоліз еритроцитів, який завершувався на 7,4 хв. Зниження стійкості до кислотного гемолізу свідчить про порушення структурної організації мембран та пришвидшене старіння еритроцитів за досліджуваної патології. Найімовірніше встановлені зміни зумовлені надмірною активацією процесів ПОЛ, розвитком оксидативно-нітративного стресу, а також глікацією протеїнів мембран еритроцитів. При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД збільшувалися тривалість гемолізу еритроцитів (до 8,33 хв проти 7,4 за умов діабету) та час досягнення максимуму гемолізу (до 3,67 хв проти 2,1 хв).

Нефракціоновані еритроцити периферичної крові представлені клітинами різного ступеня зрілості і функціональної активності, час перебування яких у крові неоднаковий. Тому цікаво було з'ясувати чи коригуючий вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за умов ЕЦД пов'язаний зі змінами відсоткового співвідношення різних за віком популяцій

еритроцитів. Встановлено перерозподіл популяційного складу еритроцитів периферичної крові, а саме відмічено зростання відсоткового вмісту еритроцитів популяцій “фізіологічно старі” та “фізіологічно юні” на 51,2 % і 72,1 %, відповідно, та зниження кількості “фізіологічно зрілі” на 20,3 % (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл еритроцитів щурів на різновікові популяції за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Умови експерименту	Співвідношення різновікових популяцій еритроцитів, %		
	”фізіологічно старі”(П1)	“фізіологічно зрілі” (П2)	“фізіологічно юні” (П3)
<i>Вміст ретикулоцитів, ‰</i>	<i>0-5</i>	<i>13-16</i>	<i>20-23</i>
Контроль	3,4±0,4	77,2±3,2	19,4±1,6
К+БФЕКЛ	3,5±0,3	76,9±3,9	19,5±0,9
ЕЦД	5,2±0,5*	61,5±1,8*	33,4±2,6*
ЕЦД+БФЕКЛ	4,5±0,3*	69,8±1,7 [#]	24,0±1,0 [#]

При цьому, еритроцити популяції “фізіологічно юні” характеризувалися зниженою стійкістю до кислотного гемолізу, про що свідчить зниження тривалості гемолізу і часу досягнення його максимуму та підвищення максимальної кількості гемолізованих клітин (табл. 3).

Таблиця 3

Показники стійкості до дії кислотного гемолітика популяцій еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

	Популяції еритроцитів	К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
Тривалість гемолізу, хв	П1	4,8±0,2	4,8±0,3	4,5±0,1	5,0±0,3
	П2	6,6±0,2	6,2±0,2	5,4±0,2*	7,0±0,1 [#]
	П3	8,3±0,7	7, 7±0,4	6,1±0,4*	8,3±0,8 [#]
Час гемолізу макс. к-сті еритроцитів, хв	П1	2,2±0,3	2,1±0,1	1,8±0,1	2,0±0,3
	П2	3,0±0,01	3,1±0,1	2,5±0,2*	3,3±0,2 [#]
	П3	3,1±0,1	3,5±0,2	2,7±0,1*	3,0±0,3
Мах частка гемолізованих еритроцитів, %	П1	31,1±3,1	30,8±2,5	31,3±1,4	28,4±0,7 [#]
	П2	30,8±3,0	27,6±1,5	31,2±2,3	31,9±3,4
	П3	26,7±3,8	28,2±1,3	34,9±3,4*	26,8±0,6 [#]

Відомо, що за умов ЦД підвищується активність сіалідаз, що зумовлює зменшення кількості сіалових кислот у складі мембранних глікокон'югатів еритроцитів. В результаті знижується поверхневий негативний заряд цих клітин крові та посилюється їхня агрегація [Venerando et al., 2002]. Встановлено підвищення агрегаційної здатності нефракціонованих еритроцитів периферичної крові, які представлені клітинами різного ступеня зрілості (рис. 7, А). При розділенні еритроцитів за віком, було встановлено, що окремі популяції еритроцитів відрізняються за ступенем альціаніндукованої агрегації, саме, найбільше максимальний ступінь агрегації підвищувався в еритроцитах популяції „фізіологічно юні” (у 3,4 рази, порівняно з контролем). Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* нормалізував показники альціаніндукованої агрегації у разі введення тваринам з ЕЦД. Подібна картина простежувалася для загальної популяції еритроцитів (рис. 7 А, Б).

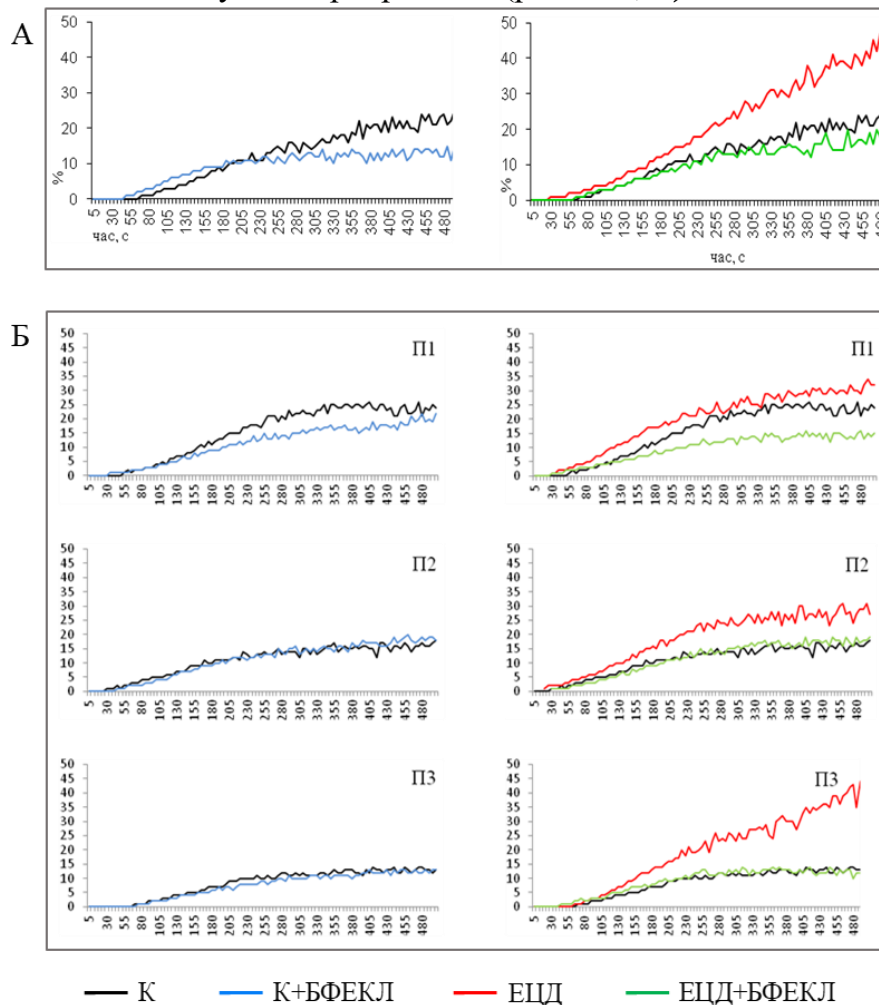


Рис. 7. Типові криві альціаніндукованої агрегації загальної популяції еритроцитів (А) та еритроцитів різновікових популяцій: П1 – “фізіологічно старі”, П2 – “фізіологічно зрілі”, П3 – “фізіологічно юні” (Б) при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД

Для дослідження структурних змін в олігосахаридних ланцюгах глікокон'югатів застосовують лектини, які вибірково зв'язуються лише з комплементарними до них вуглеводними детермінантами глікокон'югатів [Антонюк, 2005]. Як індуктори агрегації було використано лектини WGA, SNA та MAA. При використанні лектину WGA, специфічного до N-ацетил- β -D-глюкозаміну (β -DGlcNAc), встановлено зростання максимального ступеня агрегації еритроцитів на 80,5 % за умов ЕЦД. Це свідчить про

підвищення рівня експонування глікопротеїнів на поверхні еритроцитів, які комплементарні до цього лектину, а саме N-ацетил- β ,D-глюкозаміну (рис. 8).

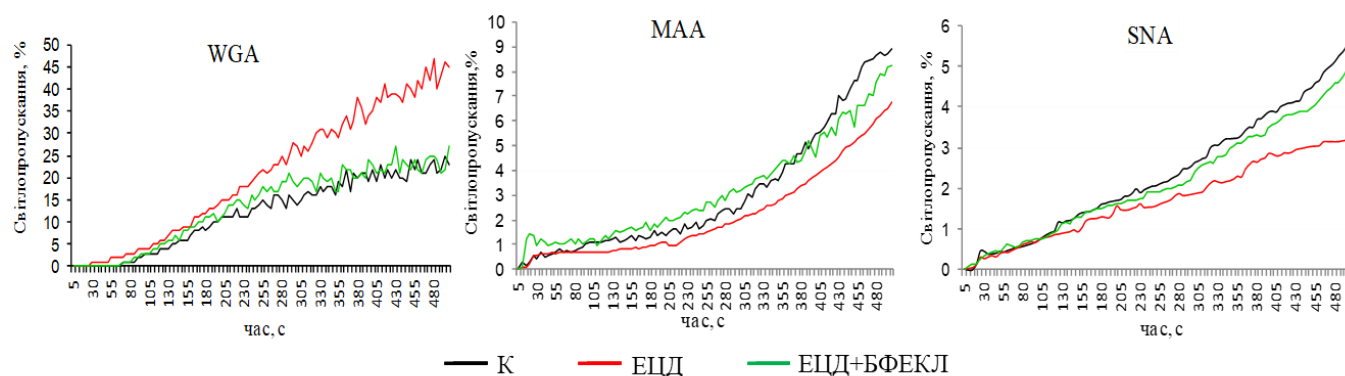


Рис. 8. Типові криві WGA, SNA та MAA-індукованої агрегації еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Для порівняння кількості залишків сіалових кислот, приєднаних до субтермінального залишку моносахариду, яким найчастіше виступає галактоза, $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ глікозидним зв'язком на поверхні еритроцитарної мембрани, як індуктори агрегації нами було використано сіалоспецифічні лектини акації амурської – MAA афінний до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal та бузини чорної – SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), специфічний до послідовностей NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DGalNAc. Встановлено, що розвиток ЕЦД супроводжується зменшенням максимального ступеня MAA- та SNA-індукованої агрегації на 19,4 % та 42,9 %, відповідно. Пригнічення процесу агрегації за умов діабету при використанні цих лектинів свідчить про знижене експонування сіалових кислот приєднаних $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидним зв'язком до субтермінальних залишків галактози (див. рис. 8).

За умов ЕЦД встановлено виражений перерозподіл сіалованих залишків олігосахаридів у складі рецепторних комплексів у популяції “фізіологічно юні” еритроцити (табл. 4).

Таблиця 4

Лектиніндукована агрегація різновікових популяцій еритроцитів при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

		К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ	
Максимальний ступінь агрегації, %	WGA	П1	40,0±4,3	31,9±1,2	27,0±1,0*	44,0±2,7 [#]
		П2	35,5±3,6	37,8±3,0	70,0±4,0*	40,0±4,1 [#]
		П3	23,2±2,0	21,7±1,5	44,5±1,5*	34,3±0,8 ^{##}
	SNA	П1	10,0±0,5	9,4±1,7	11,0±0,8	10,7±0,1
		П2	17,7±2,7	16,9±0,9	17,3±1,2	16,0±0,6
		П3	9,0±0,8	9,5±0,5	2,3±0,3*	5,7±0,7 [#]
	MAA	П1	12,3±1,2	10,8±1,6	11,0±1,1	14,7±0,7
		П2	22,3±0,2	18,4±1,0	24,7±2,7	19,7±1,8
		П3	17,0±0,8	15,9±1,7	7,0±0,5*	12,0±1,3 [#]

Показано істотне збільшення кількості глікокон'югатів, комплементарних до лектину WGA, про що свідчить збільшення максимального ступеня агрегації еритроцитів на 91,8 % та зниження сайтів зв'язування для SNA та MAA (знижується максимальний ступінь SNA- та MAA-індукованої агрегації відповідно на 74,1 % та 58,8 %). Характер перерозподілу вуглеводних детермінант мембран еритроцитів цієї фракції відповідає змінам у загальній популяції і свідчить про те, що за ЦД більшою мірою знижується експонування сіалових кислот, приєднаних ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язом у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів.

Десіалювання вуглеводних детермінант молодих форм еритроцитів при ЕЦД може призводити їхнього до захоплення галактозоспецифічними лектинами в печінці і видалення з кров'яного русла, і свідчить про пришвидшене старіння цих клітин.

Перерозподіл вуглеводних детермінант у складі поверхневих глікокон'югатів мембран еритроцитів щурів, хворих на діабет, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, відображає перебудови рецепторного апарату, які найвиразніше проявлялися у фракції "фізіологічно юні" еритроцити. Ці зміни виражалися у зниженому експонуванні залишків N-ацетил- β ,D-глюкозаміну та підвищеному експонуванні залишків N-ацетилнейрамінової кислоти, приєднаної як $\alpha 2 \rightarrow 3$ так і $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидними зв'язками до субтермінальних залишків галактози поверхневих структур еритроцитів цієї фракції.

Для підтвердження даних, отриманих методами альціан- та лектиніндукованої агрегації еритроцитів, було визначено вміст мембранозв'язаних сіалових кислот. За умов ЕЦД показано зниження вмісту сіалових кислот у термінальному положенні олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів мембран еритроцитів на 32 %, порівняно з контролем, причому у більшій мірі ліпідзв'язаних (на 39,3 %), ніж протеїнзв'язаних (на 28,5 %) (табл. 5). Водночас, у тварин цієї групи спостерігали зменшення пригнічення MAA- та SNA-індукованої агрегації еритроцитів. Отримані результати вказують на те, що зменшення вмісту сіалових кислот у складі мембранних глікокон'югатів за умов ЕЦД зумовлене відщепленням ($\alpha 2 \rightarrow 3$)- та ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язаних залишків цих цукрів. Десіалювання гліколіпідів і глікопротеїнів мембран еритроцитів при досліджуваній патології може бути пов'язано з активацією мембранозв'язаних сіалідаз. Введення екстракту *G. officinalis* за умов ЕЦД призводило до підвищення вмісту ліпідзв'язаних сіалових кислот на 57,2 %, порівняно з діабетом. Цікаво, що вміст протеїнзв'язаних сіалових кислот за цих умов не змінювався (табл. 5).

Таблиця 5

Вміст мембранозв'язаних сіалових кислот еритроцитів щурів за умов введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД

Умови експерименту	Сіалові кислоти, мкг/ мг протеїну		
	Мембранозв'язані	Ліпідзв'язані	Протеїнзв'язані
К	14,8 $\pm$ 1,4	5,2 $\pm$ 0,2	9,5 $\pm$ 0,7
К+БФЕКЛ	13,4 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,3	8,7 $\pm$ 0,67
ЕЦД	9,9 $\pm$ 1,3 *	3,2 $\pm$ 0,3 *	6,8 $\pm$ 0,2 *
ЕЦД+БФЕКЛ	12,2 $\pm$ 1,6	5,0 $\pm$ 0,4 #	7,2 $\pm$ 0,3 *

Як вже було зазначено, за умов ЕЦД знижується вміст глікокон'югатів мембран еритроцитів, які містять у своєму складі ($\alpha 2 \rightarrow 6$)- і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)- зв'язані сіалові кислоти. З метою оцінки інтенсивності процесу десіалювання мембранних глікокон'югатів еритроцитів вивчали ступінь експонування цукрів, які у структурі олігосахаридних ланцюгів гліканів

займають субтермінальну позицію щодо сіалових кислот. У більшості сіалоглікопротеїнів такими є залишки D-галактози та N-ацетил-D-галактозаміну. Відтак, нами було проведено лектинензиматичний аналіз еритроцитарних гліканів з використанням лектинів – RCA, PNA, які комплементарні до цих цукрів. За умов ЕЦД встановлено посилення зв'язування галактозоспецифічних лектинів RCA та PNA з поверхневими глікокон'югатами еритроцитів, відповідно на 69 % та 47 % (табл. 6), що вказує на зменшення кількості залишків сіалових кислот та зростання кількості субтермінальних залишків галактози.

Таблиця 6

Лектинензиматичний аналіз глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення тваринам з ЕЦД фітопрепаратів на основі *S. sonchifolius*

Умови експерименту	Лектини			
	SNA	MAA	PNA	RCA
К	0,37±0,01	0,09±0,01	0,05±0,01	0,20±0,01
К+Ел ⁵⁰⁰	0,32±0,01*	0,08±0,003	0,06±0,004	0,36±0,06*
К+Ек ⁵⁰⁰	0,32±0,01*	0,06±0,004*	0,04±0,002	0,15±0,02*
К+Ск	0,19±0,02*	0,05±0,001*	0,06±0,001	0,26±0,07*
К+Ск ^{Ps}	0,31±0,02*	0,07±0,001*	0,03±0,004*	0,22±0,02
ЕЦД	0,26±0,02*	0,05±0,01*	0,08±0,01*	0,34±0,03*
ЕЦД+Ел ⁵⁰⁰	0,14±0,01*#	0,13±0,01*#	0,03±0,001*#	0,39±0,02*
ЕЦД+Ек ⁵⁰⁰	0,16±0,04*#	0,04±0,001*	0,07±0,002*	0,23±0,04#
ЕЦД+Ск	0,51±0,03*#	0,09±0,01#	0,03±0,004*#	0,17±0,01#
ЕЦД+Ск ^{Ps}	0,40±0,02#	0,07±0,002*#	0,05±0,001#	0,19±0,03#

Таким чином, порівнюючи ефективність коригуючої дії екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* на глікановий профіль еритроцитів за умов ЕЦД варто зауважити, що нормалізуючий вплив виявляла лише суспензія кореневих бульб, стабілізована біосурфактантом PS-17. Кількість експонованих на поверхні еритроцитів залишків N-ацетилнейрамінової кислоти зростала, а β-D-галактози та N-ацетил-D-галактозаміну – знижувалася у разі введення суспензій тваринам з ЕЦД.

Зростання ступеня сіалювання глікокон'югатів мембран еритроцитів при введенні фітопрепаратів на основі екстракту *G. officinalis* та суспензії *S. sonchifolius* є молекулярним механізмом зниження агрегаційної здатності цих клітин за досліджуваної патології.

Підвищення стійкості мембран еритроцитів до гемолізу та збільшення вмісту мембранозв'язаних сіалових кислот і ступеня їхнього експонування у термінальному положенні олігосахаридних послідовностей гліканів еритроцитів при введенні фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензії *S. sonchifolius*, стабілізованої біосурфактантом PS-17 за умов ЦД є характерною ознакою омолодження пулу еритроцитів у кров'яному руслі.

Коригуючий ефект фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстрактів і суспензій отриманих з листя та кореневих бульб *S. sonchifolius* на функціональний стан лейкоцитів за умов ЕЦД

За умов хронічної гіперглікемії посилюються процеси глікування [Ruiz, Ramasamy, & Schmidt, 2020], внаслідок чого накопичуються кінцеві продукти глікації (AGEs). AGEs взаємодіють з відповідними рецепторами, які локалізовані на плазматичній мембрані макрофагів, ендотелії та астроцитах та впливають на внутрішньоклітинну передачу сигналів, експресію генів та вивільнення прозапальних цитокінів [Yamagishi, 2011]. У плазмі крові щурів з ЕЦД вміст AGEs збільшувався на 14 %, порівняно з контролем (рис. 9).

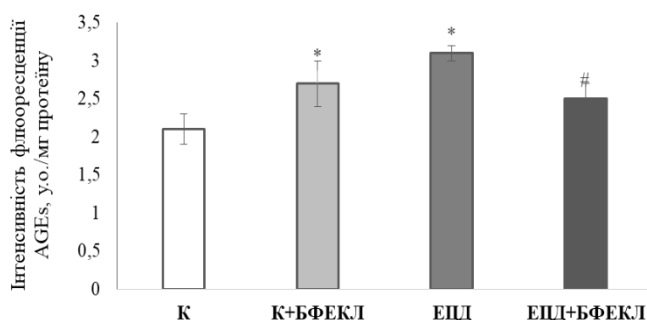


Рис. 9. Вміст AGEs у плазмі крові за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

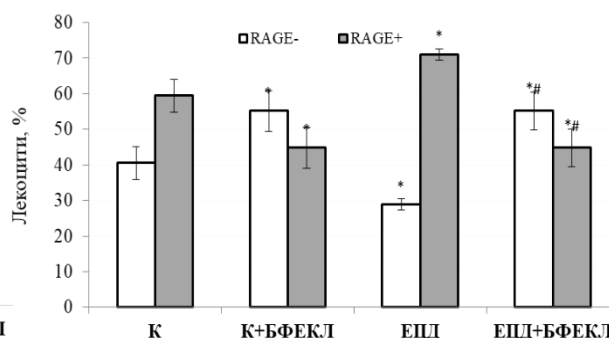


Рис. 10. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту в клітинах RAGEs за умов ЕЦД при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Підвищення вмісту AGEs у плазмі крові за умов ЕЦД зумовлювало зростання кількості рецепторів до кінцевих продуктів глікації (RAGE) експонованих на мембрані лейкоцитів. Проведений імуноцитохімічний аналіз показав збільшення кількості RAGE у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов стрептозотоцин-індукованого діабету, про це свідчить підвищення кількості RAGEs⁺-клітин на 12 %, порівняно з контролем (рис. 10). Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД зумовлювало зниження вмісту RAGEs у лейкоцитах на 37 % порівняно з діабетом. Ці дані узгоджуються з результатами, які відображають зміни вмісту AGEs у плазмі крові за впливу досліджуваного екстракту (рис. 9-10).

Водночас, результати імуноцитохімічного аналізу свідчать про зменшення кількості кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов ЕЦД. Кількість лейкоцитів із позитивною реакцією на вміст AGEs (AGEs⁺) знижувалася в 1,6 рази порівняно з контролем. Зниження рівня AGEs в лейкоцитах на тлі підвищення рівня глюкози, глікованого гемоглобіну та AGEs в крові тварин з ЕЦД свідчить про порушення надходження глюкози у лейкоцити. Це може зумовлювати порушення енергозабезпечення лейкоцитів, що неминує впливає на їхні функціональні можливості. У плазматичній мембрані лейкоцитів крові наявні інсулінонезалежні транспортери глюкози GLUT1 і GLUT3. Крім того, в літературі є дані про інсулінозалежний транспортер GLUT4 в гранулоцитах, моноцитах і лімфоцитах. Інсулінова стимуляція збільшує транслокацію GLUT4 на плазматичній мембрані мононуклеарів [Jasmin, Ali,

Ferdous, Arslan, & Biswas 2019; Maratou et al., 2007]. Порушення транслокації GLUT4 до мембрани лейкоцитів при гіпоінсулінемії призводить до порушення засвоєння глюкози та зниження вмісту AGEs у цих клітинах. Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД зумовлювало незначне підвищення кількості AGEs⁺-клітин, порівняно з діабетом.

За умов хронічної гіперглікемії відбувається преактивація лейкоцитів пов'язана зі структурно-функціональною перебудовою рецепторного апарату цих клітин, яка найчастіше зумовлена змінами структури сіаловмісних вуглеводних детермінант поверхневих глікопротеїнів. Встановлено підвищення експонування залишків N-ацетил- β ,D-глюкозаміну та зменшення експонування сіалових кислот, приєднаних $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидними зв'язками до субтермінальних залишків β ,D-галактози чи N-ацетилгалактозаміну у складі вуглеводних компонентів мембранних глікопротеїнів лейкоцитів. Міжмолекулярні взаємодії, опосередковані “демаскованими” β ,D-галактозовмісними компонентами поверхні нейтрофільних гранулоцитів, активують тирозинкіназний шлях трансдукції клітинних сигналів, кінази фокальних контактів та PI-3'-кіназу. Через галактозовмісні глікопротеїни регулюється міграція лейкоцитів під час запального процесу, що супроводжується динамічною перебудовою актинового цитоскелету [Crocker, 2005; Fernandez-Rodriguez et al., 2000)].

Тому, на наступному етапі досліджень ми вивчали вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на процес полімеризації актину, як основу локомоторної функції лейкоцитів за умов ЕЦД. Вважають, що рухливість лейкоцитів є важливим показником їхнього фізіологічного стану. За допомогою методу протокової цитометрії із застосуванням фаллоїдину міченого флюоресцентним барвником ТРІТЦ було встановлено зростання вмісту полімеризованого актину в лейкоцитах щурів за умов ЕЦД (рис. 11), що характеризує преактивований стан цих клітин. При цьому, на поверхні лейкоцитів формуються короткі псевдоподії, в яких локалізується F-актин [Hannigan M. et al., 2001]. При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД вміст F-актину в лейкоцитах достовірно знижувався, проте перевищував контрольні значення.

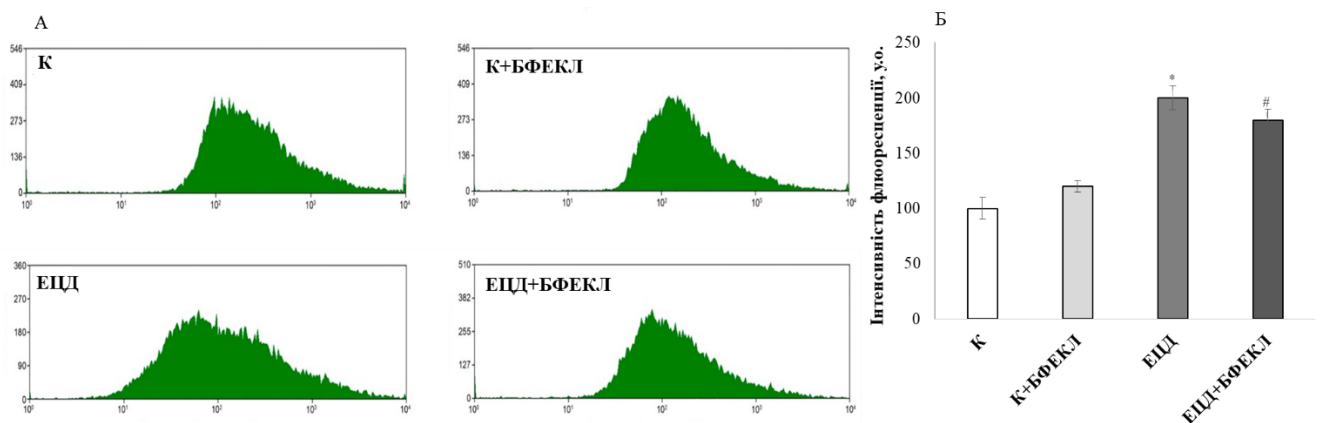


Рис. 11. Гістограми інтенсивності флюоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ у лейкоцитах периферичної крові щурів (А); Оцифровані дані гістограм, що відображають рівень полімеризованого актину у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флюоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ (Б). * - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

З метою з'ясування молекулярних механізмів, які опосередковують зміни функціонального стану лейкоцитів було проведено дослідження реорганізації актинового цитоскелету за умов ЕЦД та на фоні введення екстракту *G. officinalis* (рис. 12).

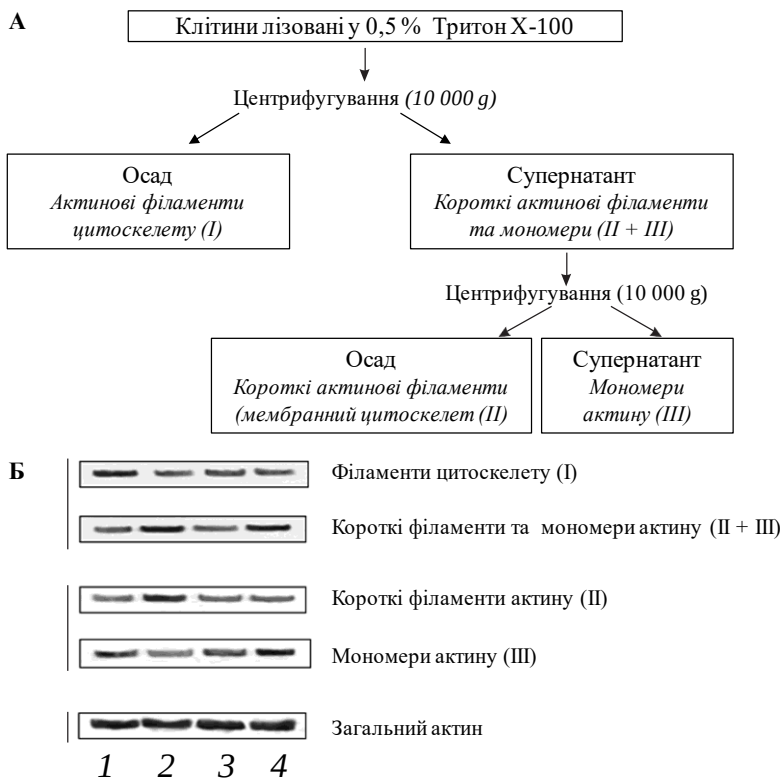


Рис. 12. Імуноблот-аналіз рівня актину у лейкоцитах щурів за умов ЕЦД при введенні екстракту *G. officinalis*:

- 1 – контроль
2 – контроль + БФЕКЛ
3 – ЕЦД
4 – ЕЦД + БФЕКЛ).

А – схема фракціонування клітинних лізатів, отриманих лізисом за допомогою 0,5 % Тритон X-100, з метою розділення фракцій, що містили довгі філаменти та мономери актину; **Б** – імуноблот-аналіз фракцій, що містили довгі актинові філаменти цитоскелету (I) та суміш коротких філаментів і мономерів актину (II + III), короткі філаменти (II) і мономери актину (III)

На рис. 13 наведено оцифровані результати імуноблот-аналізу фракцій актинових філаментів цитоскелету, коротких філаментів і мономерів актину.

У клітинах контрольної групи тварин перерозподіл актину між філаментами цитоскелету (конститутивна фракція), короткими філаментами та мономерами представлено як $58,8 \pm 3,5 \%$, $17,0 \pm 3,2 \%$ і $24,2 \pm 1,6\%$, відповідно. Полімеризований актин домінував щодо мономерів актину у співвідношенні 7,6 : 2,4. У лейкоцитах тварин з ЕЦД актин розподілявся як: $28,7 \pm 3,4\%$ – фракція філаментів цитоскелету, $52,9 \pm 2,4 \%$ – короткі актинові філаменти і $18,2 \pm 2,3\%$ припадало на мономери актину. Тобто, вміст полімеризованого актину щодо мономерів актину співвідносився як 8,2 : 1,8. Ці результати свідчать про інтенсифікацію процесу полімеризації актину за умов діабету. Також, варто зазначити, що у разі ЕЦД лейкоцити характеризуються високим вмістом коротких актинових філаментів, що у 3,1 рази перевищує контрольні значення (рис. 13, Б).

Отже, на фоні високого вмісту F-актину в лейкоцитах крові за умов ЕЦД, процес його полімеризації інтенсифікується при утворенні фракції коротких актинових філаментів. Джерелом мономерів у більшій мірі є продукти деполімеризації філаментів цитоскелету та у меншій мірі – пул мономерного актину в клітині (рис. 13, А).

Введення досліджуваного екстракту тваринам, хворим на ЦД призводило до зниження вмісту F-актину і коротких філаментів цитоскелету лейкоцитів. Співвідношення полімеризованого актину до мономерів актину становить 7,0 : 3,0 (рис. 13, Б). Корируючий вплив досліджуваного екстракту на функціональний стан лейкоцитів може реалізуватися через вплив на процеси формування елементів актинового цитоскелету та завдяки кількісному перерозподілу глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою

вуглеводних детермінант, а саме, завдяки зменшенню експонування залишків N-ацетил- β ,D-глюкозаміну та підвищенню експонування сіалових кислот приєднаних $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидними зв'язками до субтермінальних залишків галактози.

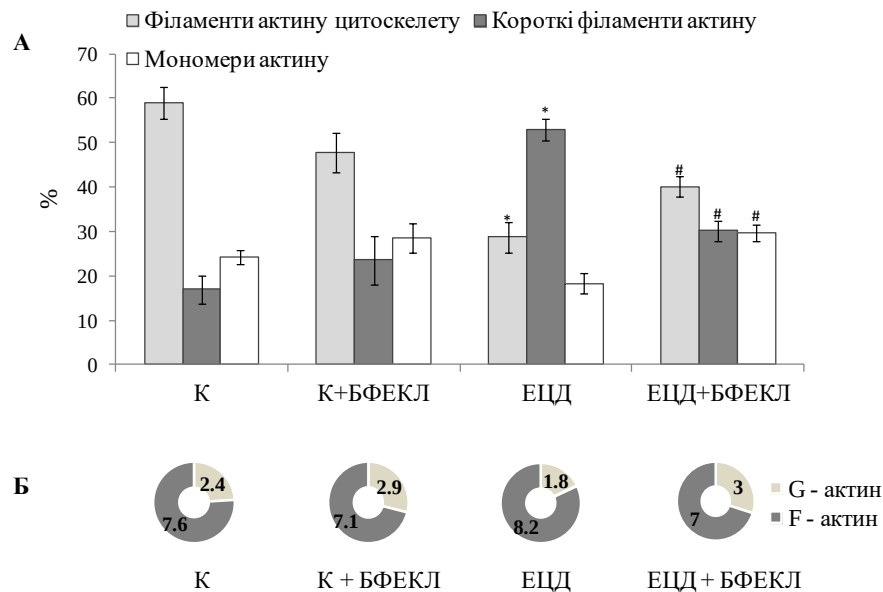


Рис. 13. Вміст актину у фракціях лізатів лейкоцитів, що містили довгі актинові філаменти, короткі філаменти та мономери актину (**А**) та співвідношення вмісту полімеризованого актину щодо мономерів актину (**Б**). Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів (рис. 11, Б). Вміст актину у кожній фракції виражений як відсоток від загального вмісту актину визначений для відповідної групи

Підвищення вмісту TNF- α при ЦД стимулює полімеризацію актину у лейкоцитах. TNF- α індукує короткочасне збільшення вмісту полімеризованого актину шляхом активації сигнального шляху Rho/ROCK у нейтрофілах. Активація сигнального шляху Rho/ROCK призводить до реорганізації цитоскелета нейтрофілів, індукуючи утворення стресових волокон [Arita et al., 2013; Nahmann & Schroeter, 2010]. Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* пригнічувало преактивацію лейкоцитів, впливаючи як на клітинний рецепторний апарат, так і на вміст хемокінів, що покращує функціональний стан цих клітин.

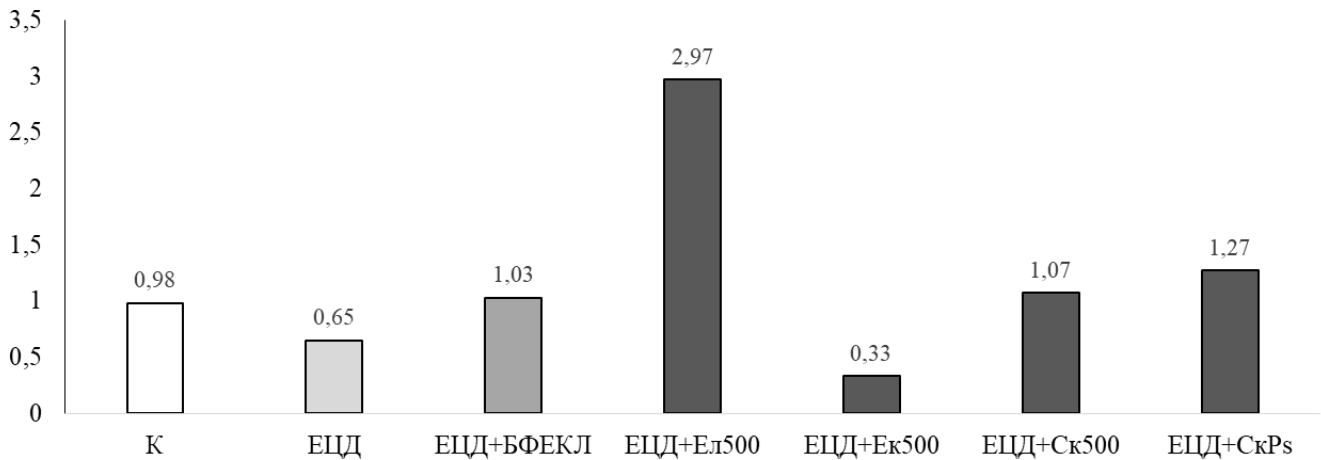
Вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на формування елементів цитоскелету за умов ЕЦД на фоні тривалої гіперглікемії може бути зумовлений наявністю у його складі компонентів з підтвердженими гіпоглікемічними та протизапальними властивостями. Ці сполуки здатні пригнічувати процеси глікації, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету, а також впливати на вміст прозапального цитокіну TNF- α , який регулює локомоторну здатність лейкоцитів.

Вплив фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* на апоптоз лейкоцитів периферичної крові щурів за умов ЕЦД

Досліджуючи співвідношення протеїнів Bcl-2/p53 та експонування фосфатидилсерину у зовнішньому шарі плазматичної мембрани лейкоцитів було зроблено висновок про інтенсифікацію процесу апоптозу імункомпетентних клітин крові за умов ЦД. Ключову роль у запуску програми апоптозу відіграє співвідношення індукторів та репресорів у клітині. Особливу увагу у цьому відношенні приділяють протеїнам регуляторам апоптозу – Bcl-2 та p53. Важливим є аналіз співвідношення Bcl-2⁺⁺/p53⁺⁺-клітин, яке характеризує інтенсифікацію або пригнічення процесу апоптозу. У тварин з ЕЦД

зменшується співвідношення Bcl-2⁺⁺/p53⁺⁺-клітин, порівняно з контролем, що свідчить про переважання проапоптичного протеїну p53 та посилення апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові (рис. 14).

Рис. 14. Співвідношення вмісту протеїнів-регуляторів апоптозу Bcl-2⁺⁺/p53⁺⁺ у



лейкоцитах за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, а також екстрактів і суспензій *S. sonchifolius*

За введення досліджуваних фітопрепаратів *S. sonchifolius* та *G. officinalis* зміни співвідношення протеїнів-регуляторів апоптозу вказують на стрімкіше підвищення вмісту антиапоптотичного протеїну Bcl-2, що свідчить про антиапоптичний коригуючий ефект досліджуваних чинників за умов ЕЦД. Найвираженішу антиапоптотичну дію за умов ЕЦД встановляли безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, водний екстракт листя та стабілізована суспензія кореневих бульб *S. sonchifolius*.

Детекцію ранніх проявів апоптозу лейкоцитів проводили за ступенем експонування фосфатидилсерину у зовнішньому шарі плазматичної мембрани. Застосування подвійного флюоресцентного фарбування клітин анексином V, міченим FITC та пропідій йодидом дає змогу здійснити детальну оцінку вираженості апоптотичних змін в лейкоцитах та отримати кількісний розподіл цих клітин крові на живі, клітини на ранніх та пізніх стадіях апоптозу.

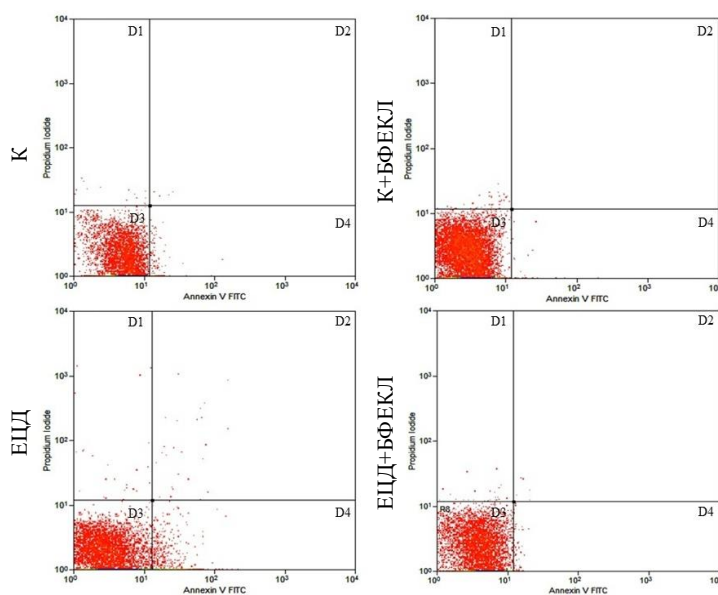


Рис. 15. Двовимірна точкова гістограма розподілу апоптотичних і життєздатних клітин в режимі DotPlot.

По осі абсцис – інтенсивність флюоресценції анекسينу V-FITC, по осі ординат – PI.

D3 (Анексин V⁻/PI⁻) – живі клітини;
 D4 (Анексин V⁺/PI⁻) – клітини з ранніми ознаками апоптозу;
 D2 (Анексин V⁺/PI⁺) – клітини з пізніми ознаками апоптозу;
 D1 (Анексин V⁻/PI⁺) – клітини на стадії некрозу

Дослідження апоптозу лейкоцитів при ЕЦД методом протокової цитофлюориметрії дало змогу виявити зростання кількості анексин-позитивних клітин майже учетверо, що свідчить про посилення екстерналізації фосфатидилсерину на поверхні лейкоцитів. Водночас кількість анексин-позитивних клітин, які давали також позитивну реакцію при фарбуванні пропідій йодидом, зростала у 2,8 рази. Це є ознакою порушення цілісності мембрани і свідчить про збільшення кількості клітин на початковій стадії апоптозу та мертвих клітин на стадії пізнього апоптозу. Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД супроводжувалося значним зниженням кількості клітин із ранніми (у 7,4 рази) та пізніми (у 4 рази) ознаками апоптозу, порівняно з діабетом практично до рівня контрольних значень.

На підставі результатів, які характеризують рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксидуридину (рис. 16) нами було зроблено висновок про підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у кістковому мозку, що є компенсаторною реакцією у відповідь на зниження кількості лейкоцитів у периферичній крові внаслідок інтенсифікації апоптозу.

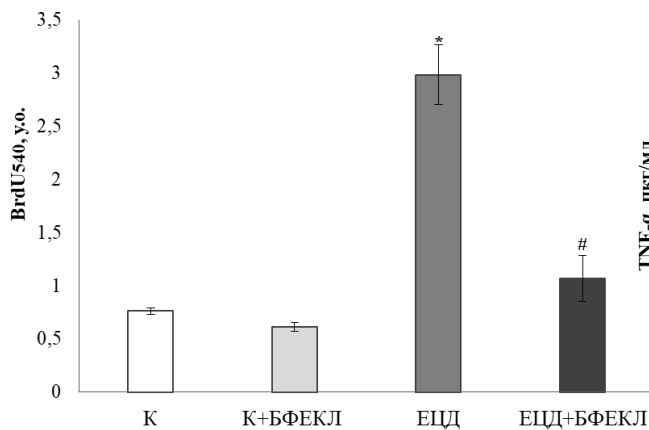


Рис. 16. Рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксидуридину за ЕЦД і на фоні введення екстракту *G. officinalis*

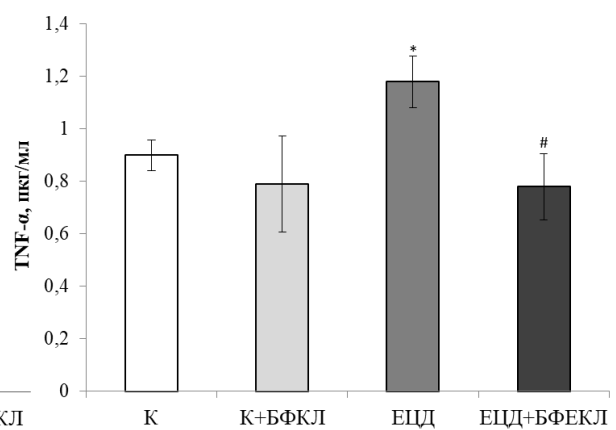


Рис. 17. Вміст ФНП-α у плазмі крові за умов ЕЦД і на фоні введення екстракту *G. officinalis*

Для того, щоб з'ясувати проліферація яких популяцій клітин кісткового мозку підвищувалася за умов ЦД було проаналізовано відсоткове співвідношення попередників нейтрофілів та лімфоцитів. Встановлено підвищення проліферативної активності попередників лімфоцитів та порушення проліферації попередників нейтрофілів за досліджуваної патології.

Підвищення проліферації лімфоцитів за умов ЦД може бути обумовлено порушенням ключових компонентів сигнальних шляхів, які залучені у процесах проліферації лімфоцитів, а саме РК С і TLR-4, про що вказано в літературі [Lien & Ingalls, 2002]. З іншого боку, TNF-α є прозапальним цитокином, який бере участь у рекрутингу лейкоцитів, а також він є необхідним для синтезу IL-12 та IFN-γ, поляризації Th1 та диференціювання Т-клітин [Zganiacz et al., 2004]. Тому збільшення кількості попередників лімфоцитів за умов ЦД може бути зумовлено зростанням вмісту TNF-α (рис. 17).

Таблиця. 7

Співвідношення (%) попередників нейтрофілів і лімфоцитів у кістковому мозку тварин з ЕЦД при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Тип клітин	К	К + БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД + БФЕКЛ
Мієлоїдний ряд				
Мієлобласти	1,9±0,2	0,8±0,09*	1,5±0,1	1,3±0,09
Метамієлоцити	18,5±1,2	13,5±0,9	12,8±1,4*	12,4±1,2
Юні та ПЯН	15,7±1,4	13,9±0,3	10,8±1,9*	13,0±0,8
СЯН	1,6±0,1	0,6±0,07*	1,1±0,15	0,7±0,009* [#]
Базофіли зрілі	0,2±0,1	0,1±0,08	0,4±0,05	-
Еозинофіли зрілі	0,4±0,06	0,4±0,1	0,3±0,08	0,41±0,13
Лімфоїдний ряд				
Лімфобласти	34,31±1,74	38,6±2,1	49,5±2,7*	40,3±1,9* [#]
Лімфоцити	27,40±1,03	32,1±2,9	23,6±2,4	30,9±1,8 [#]

Примітка: ПЯН – поліморфноядерні нейтрофіли; СЯН – сегментноядерні нейтрофіли

Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за умов ЕЦД сприяло відновленню пулу нейтрофілів кісткового мозку, зменшенню кількості лімфобластів і пригніченню процесу апоптозу лімфоцитів. З огляду на те, що TNF-α є ключовим регулятором критичних імунних функцій, його дисрегуляція пов'язана з низкою захворювань, особливо аутоімунних, до яких належить ЦД. Відтак, інгібування TNF-α має значний терапевтичний потенціал при лікуванні запальних захворювань. Ми припускаємо, що коригуючий вплив досліджуваного екстракту на проліферативну активність попередників лейкоцитів опосередкований здатністю БАР цього екстракту пригнічувати продукцію TNF-α. Наші припущення узгоджуються з іншими дослідженнями, в яких було показано здатність низки сполук знижувати рівень TNF-α та інших прозапальних цитокінів інактивуючи сигнальні шляхи NF-κB і MAPK, інгібуючи транслокацію у ядро NF-κ B і пригнічуючи фосфорилування IκBα, ERK, JNK і p38, що знижує синтез маркерів запалення [Juárez-Chairez et al., 2022; Zia et al., 2020].

Розвиток ЕЦД супроводжувався пригніченням функціональної активності нейтрофілів. Встановлено зниження поглинальної здатності та окисного метаболізму цих клітин, що є причиною зниження їхньої бактерицидності. У результаті створюються умови для незавершеного фагоцитозу та розвитку хронічних інфекційно-запальних процесів, які супроводжують ЦД.

Застосування екстрактів листя і кореневих бульб (70 та 500 мг/кг) та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* зумовлювало підвищення ефективності неспецифічних механізмів захисту організму, що у комплексі з гіпоглікемічною дією може перешкоджати розвитку і прогресуванню ускладнень ЦД. Нормалізуючий ефект на фагоцитарну активність нейтрофілів виявляли екстракт та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* (рис. 18).

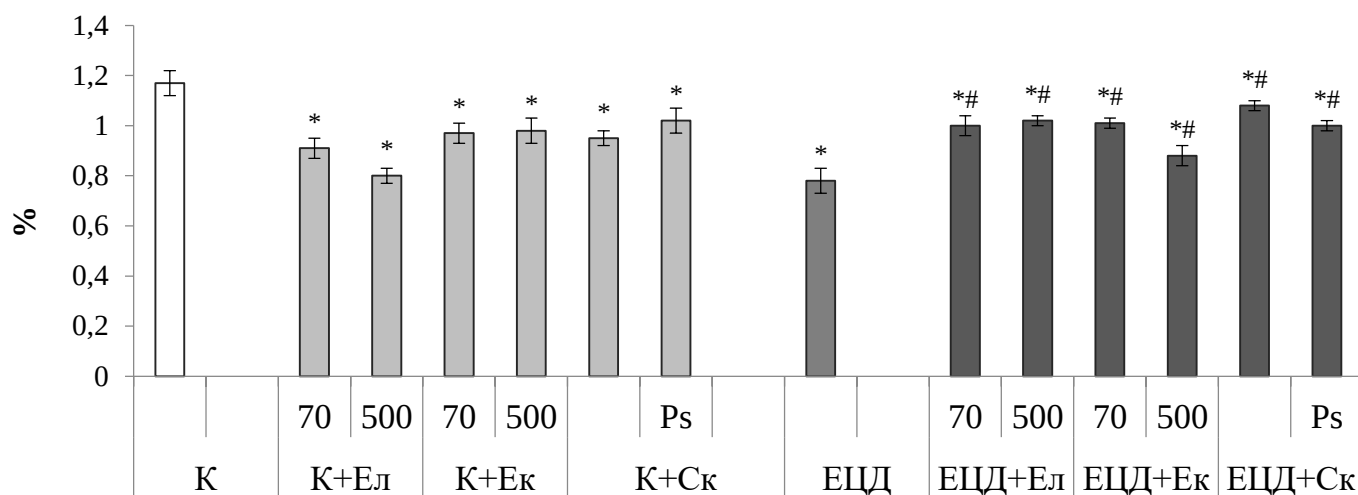


Рис. 18. Індекс завершеності фагоцитозу за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*

Встановлено підвищення активності мієлопероксидази у нейтрофілах тварин за умов ЕЦД, яка залучена у реалізацію кисеньзалежного механізму клінінгу патогенів. Натомість вміст катіонних протеїнів істотно не змінювався при ЦД (рис. 19). Ці результати узгоджуються з результатами зниження ІЗФ та НСТ-тесту, який характеризує стан і ступінь активації NADPH-оксидазної антибактерійної системи нейтрофілів і свідчать про незадовільний стан бактерицидної системи цих клітин, що може бути причиною хронічних запальних процесів, які притаманні ЦД.

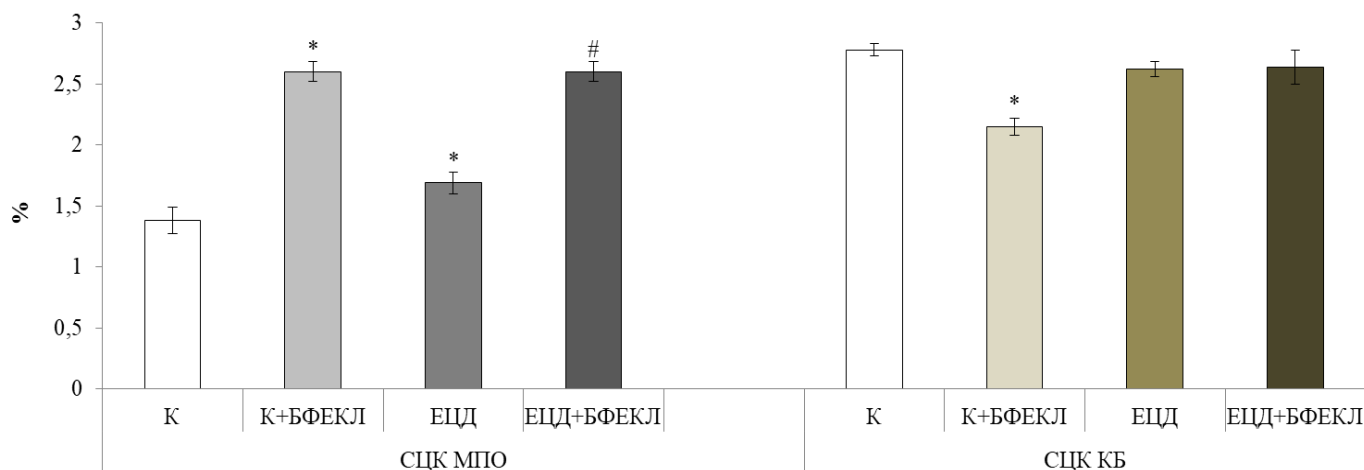


Рис. 19. Зміни середнього цитохімічного коефіцієнту (СЦК) мієлопероксидази та катіонних протеїнів у нейтрофілах здорових та хворих на ЦД тварин, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*

Застосування фітопрепаратів на основі БАР *G. officinalis* та *S. sonchifolius* за умов ЕЦД підвищує ефективність неспецифічних механізмів захисту організму. Пригнічення мієлопероксидазної активності нейтрофільних гранулоцитів при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстрактів листя і кореневих бульб, а також суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* може відігравати важливу роль у запобіганні пошкодження судин, опосередкованого лейкоцитами. Відомо, що надмірна мієлопероксидазна активність може

зумовлювати пошкодження стінок кровоносних судин шляхом утворення сильних окиснювачів (OCl^- і OBr^-) і призводити до серцево-судинних захворювань [Gorudko et al., 2012; Nicholls & Hazen, 2005]. Окрім того, нормалізуючий ефект екстракту та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* та екстракту *G. officinalis* на фагоцитарну і метаболічну активність нейтрофілів сприятиме підвищенню опірності організмів хворих на ЦД.

На підставі аналізу літературних даних ми можемо стверджувати, що встановлений нами найвираженіший коригуючий вплив екстракту та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* на показники неспецифічного імунітету може бути зумовлений наявністю у складі кореневої частини цієї рослини сполук з імуномодулюючою дією [Baroni et al., 2008; Oliveira et al., 2013].

Таким чином, антидіабетичний ефект досліджуваних фітопрепаратів, а саме, безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, екстрактів листя і кореневих бульб, а також суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* підтверджено комплексними дослідженнями гіпоглікемічної, антиоксидантної та імуномодулюючої дії.

На рис. 20 наведено узагальнюючу схему молекулярних ефектів фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* за умов ЕЦД, на якій зазначено можливі мішені впливу компонентів цих фітопрепаратів.

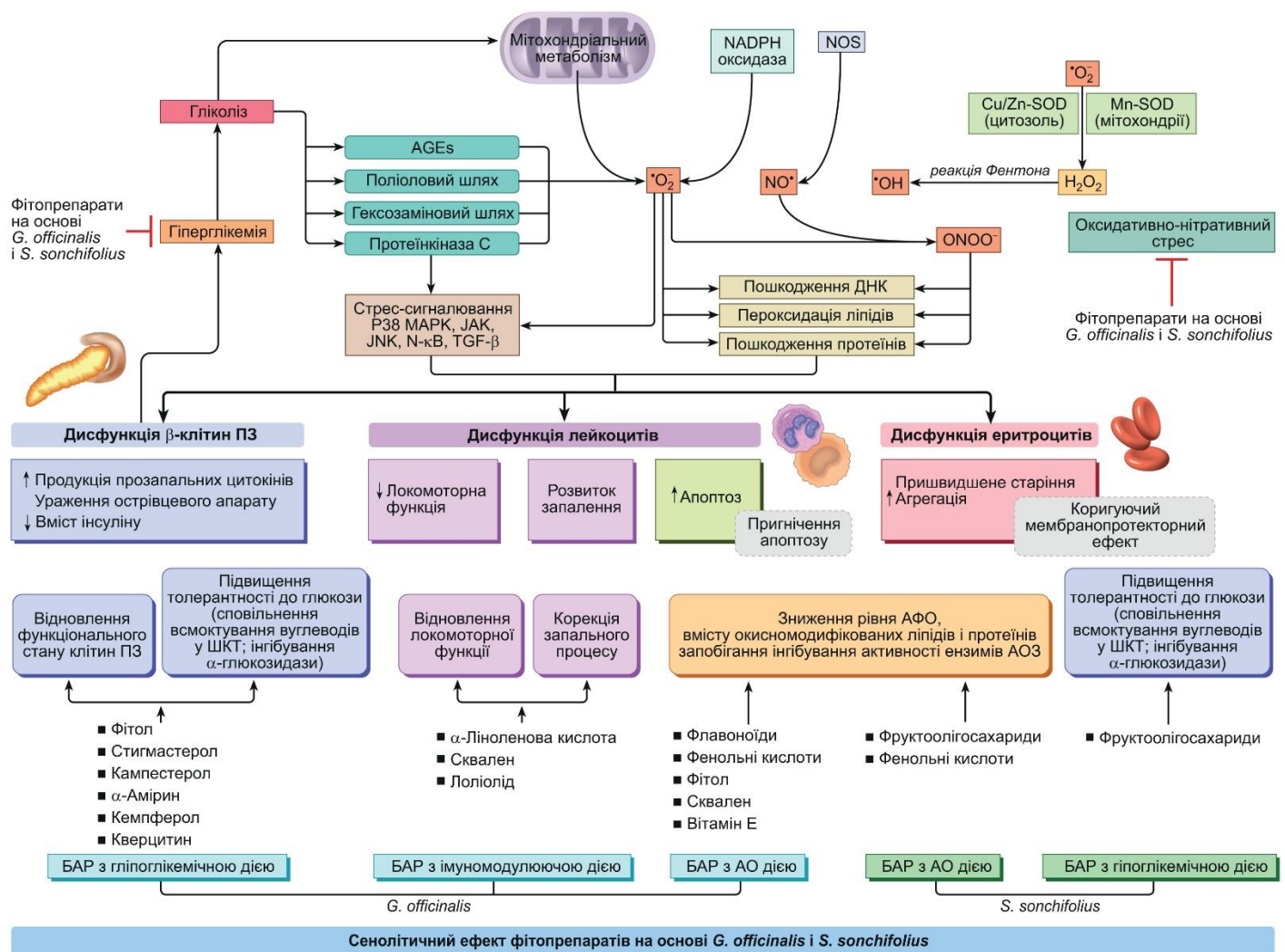


Рис. 20. Узагальнююча схема сенолітичного ефекту фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* за ЕЦД, на якій зазначено можливі мішені впливу компонентів цих фітопрепаратів (АО дія – антиоксидантна дія).

В основі гіпоглікемічної дії екстракту *G. officinalis* є здатність БАР, наявних у його складі покращувати толерантність до глюкози, виявляти цитопротекторний вплив на β -клітини підшлункової залози та підвищувати секрецію інсуліну. Гіпоглікемічна дія *S. sonchifolius* зумовлена покращенням толерантності до глюкози.

Механізм антиоксидантної дії досліджуваних фітопрепаратів реалізується шляхом зниження вмісту АФО у лейкоцитах (завдяки здатності фітокомпонентів знижувати активність трьох основних ензиматичних систем лейкоцитів, які задіяні в утворенні АФО, а саме NADPH-оксидази, мієлопероксидази та NO-синтази), пригнічення окисної модифікації протеїнів та ліпідів та зниження вмісту рецепторів до кінцевих продуктів глікації за досліджуваних умов.

Фітопрепарати на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius*, завдяки наявності у їхньому складі БАР з імуномодуючою дією зумовлюють пригнічення запального процесу, відновлення локомоторної функції лейкоцитів впливаючи на реорганізацію актинового цитоскелету та підвищення ефективності неспецифічних механізмів захисту організму.

Протекторний вплив фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензії *S. sonchifolius* на еритроцити реалізується завдяки посиленню сіалювання гліканів еритроцитів, і як наслідок зниження їхньої агрегаційної здатності, пригніченню процесів ПОЛ, що клітинним механізмом омолодження пулу еритроцитів у кров'яному руслі.

Поєднання гіпоглікемічного, антиоксидантного та імуномодуючого ефектів безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius*, за допомогою біосурфактанту PS-17 є підставою для створення на їхній основі комерційних антидіабетичних фітопрепаратів, які ефективно коригуватимуть прояви гіперглікемії, оксидативно-нітративного стресу та сприятимуть зміцненню опірності організму хворих на ЦД.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено гіпоглікемічний та антиоксидантний ефекти біологічно активних речовин, виділених з *G. officinalis* та якона, а також їхній коригуючий вплив на метаболічні, структурні та функціональні порушення клітин крові та β -клітин підшлункової залози за умов ЕЦД. Поєднання гіпоглікемічного й антиоксидантного ефектів, а також коригуючого впливу на функціональний стан імунокомпетентних клітин крові, обґрунтовує застосування цих рослин як основи для створення комерційних препаратів для комплексної терапії цукрового діабету.

1. Застосовуючи біосурфактант PS-17 було отримано стабільні фітопрепарати на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та порошку кореневих бульб *S. sonchifolius*. Методом хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад стабілізованої форми безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та виявлено у його складі сполуки з потенційними гіпоглікемічними (фітол, етиловий естер пальмітинової кислоти, фітостероли – кампестерол і стігмастерол, похідні хіназоліну), антиоксидантними (фітол, флавоноїди, фенольні кислоти, лоліолід, вітамін Е) та протизапальними (флавоноїди, метиловий естер ліноленової кислоти, α -амірин) властивостями.

2. Показано дихотомію біологічного ефекту, зумовлену компонентним складом досліджуваних препаратів *S. sonchifolius* у дозі 500 мг/кг – біологічно активні речовини суспензій кореневих бульб та екстракту листя найефективніше покращують толерантність до глюкози, сповільнюючи всмоктування у ШКТ, і як наслідок, зумовлюють рівномірніше навантаження на інсулярний апарат, натомість екстракт кореневих бульб – базальний рівень глікемії, який оцінювали за вмістом глюкози і глікозильованого гемоглобіну.
3. Встановлено виражений гіпоглікемічний ефект безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг. Стабілізована за допомогою бісурфактанту PS-17 форма цього екстракту ефективніше забезпечує компенсацію гіперглікемії за умов ЕЦД, порівняно з нестабілізованою вихідною формою. Підтверджено клітинний механізм відновлення функціонального стану β -клітин підшлункової залози при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам ЕЦД. Це зумовлено здатністю комплексу БАР, що містяться у його складі запобігати надпродукції АФО, а також пригнічувати утворення прозапального цитокіну TNF- α .
4. Підтверджено антиоксидантний ефект фітокомпонентів, виділених з *G. officinalis* та *S. sonchifolius*. Механізм антиоксидантної дії реалізується завдяки зниженню рівня АФО, пригніченню процесів окисної модифікації протеїнів і ліпідів, а також запобіганню інгібування активності ключових ензимів антиоксидантної системи.
5. Встановлено молекулярний механізм зниження локомоторної функції лейкоцитів за умов ЕЦД на рівні реорганізації актинового цитоскелету, що зумовлює неефективну роботу імункомпетентних клітин крові і є основою незавершеного фагоцитозу та хронічного запалення. Корируюча дія безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на функціональний стан лейкоцитів реалізується шляхом впливу на процеси формування елементів актинового цитоскелету та завдяки кількісному перерозподілу глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант.
6. З'ясовано, що інтенсифікація апоптозу лейкоцитів є клітинним механізмом зниження кількості імункомпетентних клітин крові за умов ЕЦД. Компенсаторною реакцією організму, що виникає у відповідь на зниження кількості лімфоцитів периферичної крові є посилення проліферативної активності кістковомозкових попередників цих клітин. Серед досліджуваних фітопрепаратів найбільше пригнічують апоптоз лейкоцитів за ЦД безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, водний екстракт листя та стабілізована суспензія кореневих бульб *S. sonchifolius*.
7. Застосування екстрактів та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* та *G. officinalis* за умов ЕЦД підвищує ефективність неспецифічних механізмів захисту організму, що у комплексі з гіпоглікемічною дією може перешкоджати розвитку і прогресуванню ускладнень ЦД. Нормалізуючий ефект на фагоцитарну і метаболічну активність нейтрофілів виявляють екстракт та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius*.
8. За змінами популяційного складу еритроцитів та зниженням їхньої стійкості до дії кислотного гемолітика, вмісту мембранозв'язаних сіалових кислот і ступеня їхнього експонування у термінальному положенні олігосахаридних послідовностей гліканів еритроцитів встановлено порушення структурно-функціонального стану еритроцитів за умов ЦД, що свідчить про пришвидшення старіння цих клітин. Застосування безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, а також екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* сприяє відновленню функціональних властивостей еритроцитів і є характерною ознакою омолодження пулу цих клітин крові. Найвираженіший протекторний ефект виявляють суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius*.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Клевета Г.** Дослідження біологічного ефекту екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis*) / Г. Клевета, А. Котик, М. Скибіцька, Я. Чайка, Н. Сибірні // Мед. хімія. – 2007. – Т. 9, № 9. – С. 21–24. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).*
2. **Клевета Г. Я.** Актуальність фармакогностичного і фармакологічного дослідження галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) з метою створення препаратів цукрознижуючої дії / Г. Я. Клевета, А. М. Котик, М. І. Скибіцька, Я. П. Чайка, Н. О. Сибірні // Фарм. часопис. – 2008. – № 3. – С. 21–24. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку)*
3. **Клевета Г. Я.** Цукрознижувальний ефект екстрактів галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) за умов експериментального цукрового діабету / Г. Я. Клевета, А. М. Котик, М. І. Скибіцька, М. Р. Хохла, Я. П. Чайка, Н. О. Сибірні // Біол. студії. – 2009. – Том 3, № 2. – С. 1–6. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).*
4. Khokhla M. Sugar-lowering effects of *Galega officinalis* L. / M. Khokhla, **G. Kleveta**, A. Kotyk, M. Skybitska, Ya. Chajka, N. Sybirna // Annal. univers. Mariae Curie-Sklodovska, sectio AA Biologia. – 2010. – XXIII. – P. 294–299. *(Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).*
5. Хохла М. Р. Аналіз змін показників кислотного гемолізу еритроцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету та введення препарату Галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) / М. Р. Хохла, **Г. Я. Клевета**, З. В. Соліляк, Я. П. Чайка, М. І. Скибіцька, Н. О. Сибірні // Мед. та клін. хімія. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 28–33. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у підготовці статті до друку).*
6. Хохла М. Р. Вплив препарату, отриманого з екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) на гематологічні показники периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету / М. Р. Хохла, **Г. Я. Клевета**, Я. П. Чайка, М. І. Скибіцька, Н. О. Сибірні // Лаб. діагностика. – 2011. – Т. 4, № 8. – С. 26 – 30. *(Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь в обговоренні результатів та підготовці статті до друку).*
7. Хохла М. Дослідження компонентного складу екстракту козлятника лікарського / М. Хохла, **Г. Клевета**, М. Лупак, О. Канюка, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірні // Вісн. Львів. Ун-ту, Сер. біол. – 2013. – Вип. 62. – С. 55–60. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь в обговоренні результатів та підготовці статті до друку).*
8. Хохла М. Вплив галеги лікарської на апоптоз лейкоцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу / М. Хохла, **Г. Клевета**, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірні // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2012. – Вип. 60. – С. 117–125. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: участь у плануванні, обговоренні результатів та підготовці статті до друку).*
9. Лупак М. Вплив безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського на вміст білків p53 та Bcl-2 у мононуклеарних лейкоцитах периферичної крові щурів за

- експериментального цукрового діабету 1 типу / М. І. Лупак, О. П. Канюка, **Г. Я. Клевета**, Я. П. Чайка, М. І. Скибіцька, Н. О. Сибірна // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – № 4, (27). – С. 104–107. (Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментів).
10. Khokhla M. The inhibition of rat leukocytes apoptosis under the condition of experimental diabetes mellitus type 1 by *Galega officinalis* L. extract / M. Khokhla, **G. Kleveta**, M. Lupak, M. Skybitska, Ya. Chajka, N. Sybirna // Curr. Issues Pharm. Med. Sci. – 2013. – Vol. 26. – №. 4. – P. 393–397. (Scopus; Q4). (Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментів, участь у написанні статті).
 11. Горбулінська О. В. Цукрознижувальна дія водних екстрактів якона (*Smilax aspera* L.) / О. В. Горбулінська, М. Р. Хохла, Л. Т. Міщенко, **Г. Я. Гачкова**, Н. О. Сибірна // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 57–64. (Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: участь у підготовці статті до друку).
 12. Лупак М. Вплив безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського на систему L-аргінін / NO у лейкоцитах периферичної крові щурів за експериментального цукрового діабету 1 типу / М. Лупак, О. Канюка, **Г. Гачкова**, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна // Медична хімія. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 108 – 110. (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису та підготовка статті до друку).
 13. Лупак М. Застосування біогенних поверхнево-активних речовин для стабілізації фітопрепарату на основі безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) / М. Лупак, М. Хохла, **Г. Гачкова**, О. Шульга, Н. Щеглова, Р. Вільданова, А. Зинь, Н. Сибірна // Біологічні Студії. – 2015. – Т. 9, №1. – С. 5–16. (Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису та підготовка статті до друку).
 14. Лупак М. Безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) попереджає оксидативний стрес в умовах експериментального цукрового діабету / М. І. Лупак, М. Р. Хохла, **Г. Я. Гачкова**, О. П. Канюка, Н. І. Климишин, Я. П. Чайка, М. І. Скибіцька, Н. О. Сибірна // Український біохімічний журнал. – 2015. – 87, № 4. – С. 78–86. (Фахове видання України, категорія А). (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису та підготовка статті до друку).
 15. Khokhla M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) improved erythrocyte resistance to oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats / M. Khokhla, O. Horbulinska, **H. Hachkova**, L. Mishchenko, O. Shulga, R. Vildanova, N. Sybirna // Advances in Diabetes and Metabolism. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 17–25. (Особистий внесок здобувача: участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
 16. Горбулінська О. Вплив якона (*Smilax aspera* L.) на клітини крові щурів за умов експериментального цукрового діабету / О. Горбулінська, М. Хохла, **Г. Гачкова**, Л. Міщенко, Р. Вільданова, О. Шульга, Н. Сибірна // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біол. – 2016. – Вип. 71. – С. 31–42. (Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

17. Horbulinska A. V. Yacon's (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) effects on postprandial glucose under experimental diabetes mellitus / A. V. Horbulinska, M. R. Khokhla, H. Ya. Hachkova, N. O. Sybirna // Ukr. Biopharm. J. – 2016. – Vol. 3, № 44. – P. 63–69. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).*
18. Горбулінська О. В. Розробка способу отримання стабільних субстанцій для функціональних харчових продуктів на основі порошку кореневих бульб якона (*Smallanthus sonchifolius* Поерр. & Endl.) та дослідження їхньої цукрознижувальної активності у щурів / О. В. Горбулінська, М. Р. Хохла, А. Р. Зинь, **Г. Я. Гачкова**, Н. О. Сибірна // Біологічні студії/Studia biologica. – 2016. – Т. 10, № 2 – С. 33–44. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).*
19. Хохла М. Порівняння гіпоглікемічної дії водних екстрактів, суспензій якона та безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської / Хохла М., **Гачкова Г.**, Сибірна Н. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Випуск 73. – С. 421–428. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, участь у підготовці статті до друку).*
20. Горбулінська О. Вплив якона (*Smallanthus sonchifolius* Поерр. & Endl.) на клітини крові щурів за умов експериментального цукрового діабету / О. Горбулінська, М. Хохла, **Г. Гачкова**, Л. Міщенко, Р. Вільданова, О. Шульга, Н. Сибірна // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Т. 71. – С. 31–42. *(Фахове видання України, категорія Б). (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у підготовці статті до друку).*
21. Lupak M. Leukocyte Actin Cytoskeleton Reorganization and Redistribution of Sialylated Membrane Glycoconjugates under Experimental Diabetes Mellitus and against the Administration of the *Galega officinalis* L. Extract / M. Lupak, **Н. Hachkova**, M. Khokhla, Ya. Chajka, M. Skybitska, and N. Sybirna // Cytol. and Genet. – 2017. – Vol. 51, No. 3. – P. 162–172. **(IF – 0,350)**. *(Фахове видання України, категорія А). (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису та підготовка статті до друку).*
22. Nagalievskaya M. *Galega officinalis* extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes / Nagalievskaya M., Sabadashka M., **Hachkova H.**, Sybirna N. // BMC Complementary and Alternative Medicine. – 2018. – Vol. 18, No. 4. – 13 p. (Scopus; IF – 2,288; Q1). *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, участь у підготовці статті до друку).*
23. Nagalievskaya M. Functional activities of neutrophils in diabetic rats are changed by yacon extracts / M. Nagalievskaya, M. Sabadashka, **Н. Hachkova**, N. Sybirna // Clinical diabetology. – 2019. – Vol 8, No 5. – 9 p. (Q4). *(Особистий внесок здобувача: планування експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).*
24. **Hachkova H.**, Nagalievskaya M., Soliljak Z., Kanyuka O., Kucharska A.-Z., Sokół-Łętowska A., Belonovskaya E., Buko V., Sybirna N. Medicinal Plants *Galega officinalis* L. and Yacon Leaves as Potential Sources of Antidiabetic Drugs // Antioxidants. – 2021. – Vol. 10, Is. 9, 1362. (Scopus, Web of Science; IF - 6,3; Q2). *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, статистична обробка даних, написання рукопису та підготовка статті до друку).*

25. Furtak Kh. Ye. The effect of *Galega officinalis* L. extract of the content the advanced glycation end products and their receptors in rat leukocytes in experimental diabetes mellitus // Kh. Ye. Furtak, **Н. Ya. Hachkova**, N. O. Sybirna // *Studia Biologica*. – 2021. – Vol. 15, N. 4. – P. 49–58. (**Фахове видання України, категорія Б**). (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).

Розділ у монографії

1. Nagalievskia M., Hachkova H., Sybirna N. *Galega officinalis* L. and immunological status in diabetes mellitus / Book Metformin / Ed. By Dr. A. P. Stoian, Dr. M. Rizzo. – IntechOpen, 2020, 75–95. (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, підготовка матеріалу до друку).

Патенти

1. Патент на корисну модель 96839 Україна, МПК (2015.01), A61K 36/00, A61P 3/10 (2006.01). Спосіб одержання безалкалоїдного екстракту з козлятника лікарського з антидіабетичною дією / Н.О. Сибірна, **Г. Я. Гачкова**, М. Р. Хохла; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u20140797890347; заявл. 15.07.2014 ; опубл. 25.02.2015, Бюл. № 4.
2. Патент на корисну модель 101202 Україна, МПК (2015.01), A23L 1/035 (2006.01), A61K 35/74 (2015.01), A61K 36/00, A61K 36/48 (2006.01), A61P 3/10 (2006.01), A61K 39/104 (2006.01). Спосіб одержання безалкалоїдного екстракту з козлятника лікарського з антидіабетичною дією / Н. О. Сибірна, Р. І. Вільданова, О. М. Шульга, Н. С. Щеглова, О. В. Карпенко, М. Р. Хохла, **Г. Я. Гачкова**, М. І. Лупак; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201503223; заявл. 06.04.2015 ; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16.

Список тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозиумах, на яких апробовано результати дисертації

1. **Клевета Г.** Дослідження біологічної дії екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis*) / Г. Клевета, А. Котлярчук, А. Котик, Н. Сибірна // Актуальні питання створення нових лікарських засобів, 17-18 травня 2007 р., Харків : тези. – Харків, 2007. – С. 180.
2. Хохла М. Цукрознижувальний ефект екстрактів галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) за умов цукрового діабету / М. Хохла, **Г. Клевета**, Я. Чайка, Н. Сибірна // V міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ у біології», 12-15 травня 2009 р., Львів : тези. – Львів, 2009. – С. 76–77.
3. **Kleveta G.** The investigation hypoglycemic effect of the extracts of *Galega officinalis* / G. Kleveta, A. Kotyk, M. Skybitska, Ya. Chajka, N. Sybirna // Scientific Conference “Biologically Active Substances: fundamental and applied problems”, May 25-30, 2009: Abstracts. – Novy Svet, AR Crimea. – P. 309–310.
4. Хохла М. Вплив екстракту галеги лікарської (*Galega Officinalis* L.) на окремі клініко-гематологічні показники периферичної крові щурів / М. Хохла, **Г. Клевета**, М. Скибіцька, Я. Чайка, Н. Сибірна // VI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, 21–24 вересня 2010 р., Львів : тези. – Львів, 2010. – С. 47.

5. Хохла М. Р. Можливості використання екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) в якості антидіабетичного засобу / М. Р. Хохла, Г. Я. Клевета, М. І. Скибіцька, А. М. Котик, Я. П. Чайка, Н. О. Сибірна // Науково-практична конференція “Актуальні питання клінічної та експериментальної фармакології”, 25–26 травня 2011 р. : тези. – Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – № 4. – С. 94–95.
6. **Kleveta G.** The use of *Galega officinalis* L. in type 1 experimental diabetes mellitus leads to normalization of differential count of rats' peripheral blood / G. Kleveta, M. Khokhla, Ya. Chayka, N. Sybirna // Polish-Ukrainian Weigl Conference „From microbiology to synthetic biology”, May 18–20, 2011, Wroclaw : Abstract. – Sepsis. – Vol. 4, N 1. – P. 113–
7. Хохла М. Вплив екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) на функціональний стан еритроцитів периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу / М. Хохла, Г. Клевета, Н. Войтович, Я. Чайка, Н. Сибірна // VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, 5–8 квітня 2011 р., Львів : тези. – Львів, 2011. – С. 36–37.
8. **Клевета Г.** Застосування галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) при експериментальному цукровому діабеті 1-го типу нормалізує показники периферичної крові щурів / Г. Клевета, М. Хохла, З. Соліляк, Я. Чайка, Н. Сибірна // Науково-практична конференція “Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання отримання і застосування”, 23–28 травня 2011 г., Новий світ : тези. – Новий світ, 2011. – С. 509–510.
9. Хохла М. Аналіз лейкоцитарної формули периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) / М. Хохла, Г. Клевета, О. Трохимчук, Я. Чайка, Н. Сибірна // VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, м. Львів, 5-8 квітня 2011 р. : збірник тез. – Львів, 2011. – С. 28-29.
10. Хохла М. Вплив препарату галеги лікарської на апоптоз лейкоцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу / М. Хохла, Г. Клевета, Я. Чайка, Н. Сибірна // 3-й З'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р., Ялта : тези. – Ялта, 2012. – С. 94.
11. Khokhla M. The antiapoptotic effect of *Galega officinalis* extract on rats peripheral blood leukocytes under the experimental type 1 diabetes mellitus / M. Khokhla, M. Lupak, O. Kaniuka, **G. Kleveta**, M. Skybitska, Ya. Chajka, N. Sybirna // VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry, May 23–24, 2013 : Abstract. – Lviv, 2013. – P. 73.
12. Лупак М. Вплив екстракту галеги лікарської на функціональний стан мононуклеарних лейкоцитів за експериментального цукрового діабету 1 типу / М. Лупак, Н. Решетняк, О. Канюка, Г. Клевета, Н. Сибірна // IX Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, приурочена до 150-ї річниці від дня народження академіка В. Вернадського, 16–19 квітня 2013 р., Львів : тези. – Львів, 2013. – С. 67–68.
13. Шукост М. Окиснювальна модифікація білків і ліпідів у крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення екстракту галеги лікарської / М. Шукост, М. Хохла, Г. Клевета, Н. Сибірна // IX Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, приурочена до 150-ї річниці від дня народження академіка В. Вернадського, 16–19 квітня 2013 р., Львів : тези. – Львів, 2013. – С. 100.
14. Шукост Н. Перерозподіл та структурні зміни сіаловмісних глікоконюгатів мембран лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення

- екстракту галеги лікарської / Н. Шукост, М. Хохла, **Г. Клевета**, Н. Сибірна // IX Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, приурочена до 150-ї річниці від дня народження академіка В. Вернадського, 16–19 квітня 2013 р., Львів : тези. – Львів, 2013. – С. 101.
15. Лупак М. NO–синтазний шлях обміну L–аргініну у лейкоцитах щурів за умов експериментального цукрового діабету 1 типу та введення безалкалоїдної фракції екстракту *Galega officinalis* L / М. Лупак, О. Канюка, **Г. Гачкова**, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна // Міжн. наук. конф. «Механізми функціонування фізіологічних систем», приурочена до 70–ліття біологічного факультету та 230–ліття фізіології у Львівському університеті, 15 – 17 жовтня 2014 р., Львів : Збірник тез. – Львів, 2014. – С. 60–61.
 16. Лупак М. Вплив безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського на інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення білків і ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи захисту у лейкоцитах щурів за умов експериментального цукрового діабету / М. Лупак, М. Шукост, О. Канюка, **Г. Гачкова**, Н. Сибірна // X Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, 16–19 квітня 2014 р., Львів : Збірник тез – Львів, 2014. – С. 31–32.
 17. Лупак М. Корируючий ефект екстракту Козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) за умов експериментального цукрового діабету / М. Лупак, О. Канюка, **Г. Гачкова**, Я. Чайка, М. Скибіцька // XI Український біохімічний конгрес, 6–10 жовтня 2014 року, Київ : Український біохімічний журнал. – Т. 86, № 5, додаток 1. – Київ, 2014. – С. 201–202.
 18. Канюка О. Гіпоглікемічний ефект антоціанідинів капусти червонокочанної за умов експериментального цукрового діабету / О. Канюка, М. Лупак, **Г. Гачкова**, Е. Нарута, В. Буко // XI Український біохімічний конгрес, 6–10 жовтня 2014 року, Київ : Український біохімічний журнал. – Т. 86, № 5, додаток 1. – Київ, 2014. – С. 78–79.
 19. Лупак М. NO-синтазний шлях обміну L-аргініну у лейкоцитах щурів за умов експериментального цукрового діабету 1 типу та введення безалкалоїдної фракції екстракту *Galega officinalis* L. / М. Лупак, О. Канюка, **Г. Гачкова**, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція “Механізми функціонування фізіологічних систем”, 15–17 жовтня 2015 р.: збірник тез. – Львів, 2014. – С. 60–61.
 20. Лупак М. Біохімічні зміни у лейкоцитах щурів за експериментального цукрового діабету та на фоні введення екстракту козлятника лікарського / М. Лупак, О. Канюка, **Г. Гачкова**, Я. Чайка, М. Скибіцька // XI Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, 20–23 квітня 2015 р., Львів : тези. – Львів, 2015. – С. 70–71.
 21. Lupak M. Effect of alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* L. extract on the rats leukocytes precursors proliferation and differentiation under experimental diabetes mellitus / M. Lupak, O. Gryhorchuk, **H. Hachkova**, Ya. Chajka, M. Skybitska, N. Sybirna // International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology, October 11–13, 2015, Lviv : Abstract. – Lviv, 2015. – P. 122.
 22. Григорчук О. Вплив екстракту козлятника лікарського на процеси проліферації та диференціації кісткомозкових клітин-попередників лейкоцитів за експериментального цукрового діабету / О. Григорчук, М. Лупак, **Г. Гачкова**, Н. Сибірна // XII Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, 19–21 квітня 2016 р. : збірник тез. – Львів. – С. 29–30.

23. **Hachkova H.** *Galega officinalis* extract effects on pancreatic islets cells structural and functional state under the condition of experimental diabetes mellitus / H. Hachkova, M. Lupak, E. Belonovskaya, N. Sybirna // 5-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 2–6 жовтня 2016 р. : збірник тез. – Одеса. – С. 20.
24. Дашенко А. Створення фітопрепаратів на основі *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl., H. Robinson) / А. Дашенко, М. Хохла, О. Горбулінська, Н. Сибірна, **Г. Гачкова**, Л. Міщенко // Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії”, присвячена до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова, 16–18 листопада 2016 р. : матеріали конференції. – Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Т. 73. – С. 438–439.
25. Сибірна Н. О. Функціональні харчові продукти з антиоксидантною та цукрознижувальною дією / Н. О. Сибірна, М. В. Сабадашка, **Г. Я. Гачкова**, М. Р. Нагалєвська // XII Український біохімічний конгрес, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. : матеріали XII Українського біохімічного конгресу. – Медична та клінічна хімія. – 2019. – Т. 21, № 3 (додаток). – С. 322.
26. Фуртак Х., **Гачкова Г.**, Сибірна Н. Вміст рецепторів кінцевих продуктів глікації у мембранах лейкоцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету та при введенні екстракту козлятника лікарського // XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 19–21 квітня 2021 р.: збірник тез. – Львів, 2021. – С. 51.
27. **Гачкова Г.**, Сибірна Н. Антидіабетичний ефект комплексу біологічно активних речовин, виділених з *Galega officinalis* L. // Науково-практична on-line конференція з міжнародною участю “Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії”, 1 жовтня 2021 р. : збірник тез. – Харків, 2021. – С. 298.
28. **Hachkova H. Ya.**, Sybirna N. O. Effects of extract *Galega officinalis* on the structural and functional state of the pancreas system and leukocytes under experimental diabetes mellitus // V Міжнародна науково-практична конференція “KyivPharma-2021. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття”, 26 листопада 2021 р. : збірник наукових праць “Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин”. Випуск 4. – Київ, 2022. – С. 166.
29. Фуртак Х. Вплив екстракту козлятника лікарського на процеси глікації та окисної модифікації білків за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету / Х. Фуртак, **Г. Гачкова**, Н. Сибірна // XVIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 6 жовтня 2022 р. : збірник тез. – Львів, 2022. – С. 28
30. Бугрин М. Гіполіпідемічна дія безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського за умов експериментального цукрового діабету / М. Бугрин, **Г. Гачкова**, Н. Сибірна // XVIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 6 жовтня 2022 р. : збірник тез. – Львів, 2022. – С. 23.
31. **Гачкова Г.** Біологічно активні речовини козлятника лікарського та якона модулюють функціональний стан лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету/ **Г. Гачкова**, М. Нагалєвська, Н. Сибірна // Шоста міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 6-7 жовтня 2022 р. : матеріали VI Міжнародної наукової конференції. – Дніпро: “Ліра”, 2022 – 82–83 с.

32. Бугрин М. Б., Гачкова Г. Я., Глуценко Л. А., Сибірна Н. О. Вплив біологічно активних речовин козлятника лікарського на активність NO-синтази та вміст нітрит- та нітрат-аніонів у лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету // Матеріали VI Міжнародної наукової конференції “Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень”. Березоточча. – 2023. – С. 166–170.
33. Бугрин М. Активність індукцибельної NO-синтази у підшлунковій залозі щурів за умов цукрового діабету та введення екстракту козлятника лікарського / М. Бугрин, Г. Гачкова, Н. Сибірна // XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена до 90-річчя від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія Романовича. – 26–28 квітня жовтня 2023 р. : збірник тез. – Львів, 2023. – С. 26.

АНОТАЦІЯ

Гачкова Г. Я. Молекулярні основи антидіабетичної дії біологічно активних речовин, виділених з лікарських рослин *Galega officinalis* L. та *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Інститут біології клітини Національної академії наук України, Львів, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню молекулярно-клітинних механізмів коригуючого впливу біологічно активних речовин *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський) та *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (якон) на метаболічні, структурні і функціональні порушення клітин крові та підшлункової залози за умов ЕЦД.

Значну увагу приділено розробці способів стабілізації екстракту *G. officinalis*, позбавленого від алкалоїдів та суспензії порошку кореневих бульб *S. Sonchifolius* за допомогою рамноліпідних біоПАР, що синтезуються штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 (сурфактант PS-17). Методом газової хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*. У складі екстракту виявлено сполуки з потенційними гіпоглікемічними (фітол, етиловий естер пальмітинової кислоти, фітостероли – кампестерол і стігмастерол, похідні хіназоліну), антиоксидантними (фітол, флавоноїди, фенольні кислоти, вітамін Е) та протизапальними (флавоноїди, метиловий естер ліноленової кислоти, α -амірин) властивостями.

Досліджено гіпоглікемічні, антиоксидантні та імуномодулючі ефекти біологічно активних речовин, виділених з лікарських рослин *G. officinalis* та *S. sonchifolius* – потенційних джерел антидіабетичних фітопрепаратів.

Встановлено виражену гіпоглікемічну дію безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 600 мг/кг за умов ЕЦД, про що свідчить зниження концентрації глюкози і глікозильованого гемоглобіну у крові, підвищення толерантності клітин до глюкози, зростання вмісту С-пептиду та інсуліну у плазмі крові щурів. Експериментально підтверджено цитопротекторну дію досліджуваного екстракту на клітини підшлункової залози при введенні його у дозі 1200 мг/кг (збільшення кількості острівців Лангерганса на стандартній площі зрізу, їхньої середньої площі, діаметру, об’єму та кількості β -клітин щодо діабету).

З’ясовано дихотомію біологічного ефекту, зумовлену компонентним складом досліджуваних препаратів *S. sonchifolius* у дозі 500 мг/кг – біологічно активні речовини суспензій кореневих бульб та екстракту листя якона найефективніше покращують толерантність до глюкози, сповільнюючи всмоктування у ШКТ, і як наслідок, зумовлюють

рівномірніше навантаження на інсулярний апарат, натомість екстракту кореневих бульб – зниження базального рівня глікемії, який оцінювали за вмістом глюкози і глікозильованого гемоглобіну.

Підтверджено антиоксидантний ефект біологічно активних речовин *G. officinalis* та *S. sonchifolius*. Механізм антиоксидантної дії реалізується шляхом зниження рівня АФО, пригнічення процесів окисної модифікації протеїнів і ліпідів, зниженням вмісту рецепторів до кінцевих продуктів глікації, а також завдяки запобіганню інгібування активності ключових ензимів антиоксидантної системи.

Розвиток ЕЦД супроводжувався порушенням проліферації нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів, підвищенням мієлопероксидазної активності нейтрофільних гранулоцитів, пригніченням міграційної, фагоцитарної здатності та посиленням апоптозу лейкоцитів. Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за умов ЕЦД сприяє відновленню пулу нейтрофілів кісткового мозку, зменшенню кількості лімфобластів і зумовлює пригнічення процесу апоптозу лейкоцитів.

Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* пригнічує преактивацію лейкоцитів за досліджуваної патології, впливаючи як на їхній рецепторний апарат, так і на вміст хемокінів, що покращує функціональний стан цих клітин. Корируючий вплив екстракту *G. officinalis* на функціональний стан лейкоцитів може реалізуватися завдяки впливу на процеси формування елементів актинового цитоскелету та кількісному перерозподілу глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант.

Підвищення стійкості мембран еритроцитів до гемолізу та збільшення вмісту мембранозв'язаних сіалових кислот і ступеня їхнього експонування у термінальному положенні олігосахаридних послідовностей гліканів еритроцитів при введенні фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензії *S. sonchifolius* за умов ЦД є характерними ознаками омолодження пулу еритроцитів у кров'яному руслі.

Поєднання гіпоглікемічного, антиоксидантного та імуномодуючого ефектів фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензії *S. sonchifolius* є підставою для створення на їхній основі антидіабетичних фітопрепаратів природного походження, які ефективно коригуватимуть прояви гіперглікемії, оксидативно-нітративного стресу та сприятимуть зміцненню опірності організму хворих на цукровий діабет.

Ключові слова: цукровий діабет, *Galega officinalis*, *Smallanthus sonchifolius*, оксидативно-нітративний стрес, антидіабетичний ефект, лейкоцити, еритроцити, β -клітини підшлункової залози.

SUMMARY

Hachkova H. Ya. Molecular basis of antidiabetic action of biologically active substances isolated from medicinal plants *Galega officinalis* L. and *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson. – Qualification scientific work, Manuscript.

Thesis for a scientific degree of doctor of biological sciences in specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. Institute of Cell Biology, National Academy of Science of Ukraine, Lviv, 2024

The dissertation is dedicated to investigation of molecular and cellular mechanisms of corrective influence of biologically active substances from *Galega officinalis* and *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson on the metabolic, structural and functional disorders of blood cells and pancreas under experimental diabetes mellitus type 1.

Considerable attention is paid to the development of stabilization methods of alkaloid-free fraction from *G. officinalis* and suspension of powder of root tubers of *S. sonchifolius* using biosurfactant PS-17 (biosynthesized by *Pseudomonas* sp. PS-17 surface-active products). Using gas chromatographic-mass spectrometric method were found component composition of stabilized alkaloid-free fraction from *G. officinalis*. Compounds with potential hypoglycemic (phytol, palmitic acid ethyl ester, phytosterols – campesterol and stigmasterol, quinazoline derivatives), antioxidant (phytol, flavonoids, phenolic acids, vitamin E) and anti-inflammatory (flavonoids, linolenic acid methyl ester, α -amyrin) properties were identified.

Hypoglycemic, antioxidant and immunomodulatory effects of extracts of medicinal plants *G. officinalis* L. and *S. sonchifolius* Poepp. & Endl. as potential sources of biologically active substances with antidiabetic action have been studied.

The pronounced hypoglycemic effect of *G. officinalis* extract, devoid of alkaloids, at a dose of 600 mg/kg in experimental diabetes mellitus (EDM) has been proven. The established effect is evidenced by a decrease in the concentration of glucose and glycosylated hemoglobin in the blood, increase glucose tolerance of cells, increase C-peptide and insulin content in the plasma of rats' blood. The cytoprotective effect of the studied extract on pancreatic cells at a dose of 1200 mg/kg was experimentally confirmed (an increase was found in the number of Langerhans islets, their average area, diameter, volume, and a number of β -cells relative to these indicators in animals with diabetes).

The dichotomy of the biological effect was confirmed. It was caused by the component composition of the studied yacon preparations at a dose of 500 mg/kg - the biologically active substances of root tuber suspensions and yacon leave extract most effectively improve glucose tolerance, slowing absorption in the gastrointestinal tract, and as a result, cause a more even load on the insular apparatus. Instead, root tuber extract - the basal level of glycemia, which was assessed by the content of glucose and glycosylated hemoglobin.

The antioxidant effect of the biologically active substances of yacon and the non-alkaloid fraction of the *G. officinalis* extract has been confirmed. The mechanism of antioxidant action is realized due to the reduction of the level of ROS, inhibition of the processes of oxidative modification of proteins and lipids, as well as prevention of inhibition of the activity of key enzymes of antioxidant protection.

Diabetes mellitus development was accompanied by violation of neutrophils and lymphocytes proliferation. increased activity of granulocytes MPO and enhanced lymphocytes apoptosis. Administration of *G. officinalis* extract under the condition of EDM promotes the restoration of neutrophils bone marrow pool, the reduction of lymphoblasts number and causes inhibition of the lymphocytes apoptosis process. Normalization of neutrophil functional competence by using a *G. officinalis* can improve the course of the disease and in addition to their hypoglycemic action may prevent the development and progression of diabetes complications.

The administration of the alkaloid-free extract of *G. officinalis* inhibited the preactivation of leukocytes, affecting both the cellular receptor apparatus and the content of chemokines, which improves the functional state of these cells. The corrective effect of the studied extract on the functional state of leukocytes can develop via the process of formation of actin cytoskeleton elements and by qualitative and quantitative changes in structures of the carbohydrate components of surface membrane glycoconjugates of the cells.

An increase in the resistance of erythrocyte membranes to hemolysis and an increase in the content of membrane-bound sialic acids and the degree of their exposure in the terminal position of the oligosaccharide sequences of erythrocyte glycans during the administration of herbal preparations based on the alkaloid-free extract of *G. officinalis* and *S. sonchifolius* suspension under

conditions of diabetes is a characteristic feature of the rejuvenation of the erythrocyte pool in bloodstream.

The combination of hypoglycemic, antioxidant and immunomodulatory effects of herbal preparations based on the alkaloid-free extract of *G. officinalis* and the suspension of *S. sonchifolius* is the basis for the creation of antidiabetic drugs of natural origin based on them, which will effectively correct the manifestations of hyperglycemia, oxidative-nitrative stress and help strengthen the body's resistance in patients with diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, *Galega officinalis* L., *Smallanthus sonchifolius*, antidiabetic effect, oxidative-nitrative stress, erythrocytes, leukocytes, pancreatic β -cells.

Підписано до друку 04.01.2024 р. Папір офсетний.
Формат 60×84/16. Умов. друк. арк. 1,7. Тираж 100 прим. Зам. 309
Друк СПДФО Марусич М.М.
м. Львів, пл. князя Я. Осмомисла, 5/11
Тел./факс: (032) 261-51-31
e-mail: interpret-m@ukr.net