

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

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.*) H. ROBINSON**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Г. Я. Гачкова

Науковий консультант:
Сибірна Наталія Олександрівна
докторка біологічних наук, професорка

Львів 2024

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 експериментального цукрового діабету (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. Еспериментально 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 активних форм Оксигену, 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.

ПУБЛІКАЦІЇ ЗДОБУВАЧА

Статті

1. **Клевета Г.** Дослідження біологічного ефекту екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis*) / Г. Клевета, А. Котик, М. Скибіцька, Я. Чайка, Н. Сибірна // 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. Сибірна // 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. Сибірна // 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. Сибірна

- // 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. Сибірنا // 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. Сибірна // 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. Сибірна // 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 (*Smalanthus Sonchifolius* Poir. & Endl.) / 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, **Н. 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 (*Smalanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) 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, Н. 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* Poepp. & 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* Poepp. & 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. Nagalievskia M. *Galega officinalis* extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes / Nagalievskia 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. Nagalievskaya 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 симпозіумах, 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 3-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. Сибірня // 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. Сибірня // 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. Сибірня // 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. Сибірня // 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. Коригуючий 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. Дашченко А. Створення фітопрепаратів на основі *Smallanthus sonchifolius* (Роепп. & Endl., Н. Robinson) / А. Дашченко, 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.**, Глущенко 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. Сибірня // 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	27
ВСТУП.....	30
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	40
1.1. Механізми, які залучені до виникнення дисфункції β -клітин підшлункової залози при цукровому діабеті.....	40
1.1.1. Стрес ендоплазматичного ретикулуму.....	40
1.1.2. Мітохондріальна дисфункція.....	41
1.1.3. Оксидативний стрес.....	42
1.1.4. Взаємозв'язок між мітохондріальною дисфункцією, стресом ER та оксидативним стресом.....	44
1.1.5. Вплив оксидативного стресу на сигнальні шляхи у β -клітинах.....	46
1.1.6. Антиоксидантний статус β -клітин підшлункової залози.....	48
1.2. Лейкоцити та їхня роль в етіопатогенезі цукрового діабету 1 типу.....	50
1.2.1. Функції нейтрофілів при ЦД 1 типу.....	50
1.2.2. Міжклітинні взаємодії при ЦД 1 типу.....	53
1.3. Антидіабетичний потенціал біологічно активних речовин лікарських рослин.....	56
1.3.1. Механізми антидіабетичної дії біологічно активних речовин лікарських рослин.....	56
1.3.2. Лікарські рослини <i>Galega officinalis</i> та <i>Smallanthus sonchifolius</i> – потенційні джерела біологічно активних речовин з антидіабетичною дією.....	61
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	69
2.1. Дизайн експерименту.....	70
2.2. Характеристика об'єкту досліджень.....	70
2.3. Отримання безкалоїдної фракції екстракту <i>G. officinalis</i> та стабілізація за допомогою біокомплексу PS.....	71
2.4. Аналіз компонентного складу безкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i>	73

2.5. Отримання водних екстрактів листя і кореневих бульб, а також отримання та стабілізація суспензії порошку кореневих бульб <i>S. sonchifolius</i> за допомогою сурфактанту PS-17.....	75
2.6. Визначення концентрації глюкози та толерантності клітин до глюкози.....	76
2.7. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну.....	77
2.8. Імуноензимний аналіз вмісту інсуліну, С-пептиду та фактора некрозу пухлин альфа.....	77
2.9. Світлова мікроскопія клітин підшлункової залози.....	78
2.10. Виділення та визначення кількості лейкоцитів периферичної крові щурів.....	79
2.11. Флюоресцентно–мікроскопічне дослідження рівня активних форм Оксигену у лейкоцитах периферичної крові щурів.....	79
2.12. Отримання лізатів лейкоцитів.....	80
2.13. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів.....	80
2.14. Карбонільних груп протеїнів.....	81
2.15. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікації протеїнів у плазмі крові.....	81
2.16. Імуноцитохімічна детекція вмісту AGEs та RAGE у лейкоцитах.....	82
2.17. Визначення активності ензимів антиоксидантного захисту.....	83
2.18. Визначення вмісту відновленого глутатіону.....	84
2.19. Визначення антиоксидантної активності <i>in vitro</i>	85
2.20. Визначення вмісту нітрит- і нітрат-аніонів, сумарної активності NO-синтази та індукцйбельної ізоформи NO-синтази.....	86
2.21. Визначення концентрації протеїнів за методом Лоурі.....	87
2.22. Методи дослідження стану актинового цитоскелету.....	87
2.22.1. Кількісна оцінка вмісту полімеризованого актину методом	

протокової цитометрії з використанням фалоїдину міченого ТРІТЦ.....	87
2.22.2. Фракціонування актину у лізатах лейкоцитів.....	88
2.22.3. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі.....	88
2.22.4. Імоноблотинг протеїнів.....	89
2.23. Методи дослідження апоптозу лейкоцитів.....	89
2.23.1. Імуноцитохімічна детекція вмісту протеїнів p53 і Bcl-2.....	89
2.23.2. Флюоресцентний аналіз апоптозу за зв'язуванням анексину V....	90
2.23.3. Біохімічна детекція апоптозу за визначенням вмісту фрагментованої ДНК.....	91
2.24. Виділення клітин кісткового мозку та оцінка проліферативної активності попередників лейкоцитів.....	91
2.25. Забарвлення мазків (Май-Грюнвальда-Романовського-Гимзи за Папенгеймом) та оцінка морфологічного складу клітин кісткового мозку).....	92
2.26. Визначення кількості та добової продукції ретикулоцитів.....	92
2.27. Фракціонування еритроцитів у градієнті густини сахарози.....	93
2.28. Визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика.....	94
2.29. Визначення агрегаційної здатності еритроцитів та лейкоцитів.....	94
2.30. Визначення вмісту сіалових кислот.....	95
2.31. Лектинензиматичний аналіз глікокон'югатів мембран еритроцитів та лейкоцитів.....	96
2.32. Визначення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів.....	97
2.33. Визначення бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів.....	98
2.33.1. Оцінка кисень-залежної бактерицидної активності нейтрофілів в реакції відновлення нітросинього тетразолію.....	98
2.33.2. Дослідження мієлопероксидазної активності у нейтрофілах.....	98
2.33.3. Цитохімічне визначення вмісту катіонних протеїнів у нейтрофілах.....	99
2.34. Статистична обробка результатів.....	100

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	101
3.1. Розробка способів отримання стабільних фітопрепаратів на основі безалкалоїдної фракції екстракту <i>G. officinalis</i> та порошку кореневих бульб <i>S. sonchifolius</i> застосовуючи біосурфактант PS-17.....	101
3.1.1. Отримання і стабілізація безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> за допомогою біосурфактанту PS-17.....	103
3.1.2. Дослідження компонентного складу безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> , стабілізованого біосурфактантом PS-17.....	106
3.1.3. Розробка способу отримання стабільної суспензії на основі порошку кореневих бульб <i>S. sonchifolius</i>	110
3.2. Гіпоглікемічна дія водних екстрактів і суспензій <i>S. sonchifolius</i> а та безалкалоїдної фракції екстракту <i>G. officinalis</i>	114
3.3. Вплив безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> на структурно-функціональний стан клітин острівцевого апарату підшлункової за умов ЕЦД.....	128
3.4. Антиоксидантний потенціал біологічно активних речовин виділених з <i>G. officinalis</i> та <i>S. sonchifolius</i>	133
3.5. Корируючий ефект безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> , а також екстрактів і суспензій <i>S. sonchifolius</i> на морфофункціональний стан еритроцитів за умов ЕЦД.....	148
3.5.1. Мембраностабілізуюча дія екстракту безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> та екстрактів і суспензій <i>S. sonchifolius</i> за умов стрептозотоцин-індукованого діабету.....	148
3.5.2. Структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення позбавленого алкалоїдів екстракту <i>G. officinalis</i> та екстрактів і суспензій <i>S. sonchifolius</i> тваринам з ЕЦД.....	156

3.6. Корируючий ефект фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> та екстрактів і суспензій отриманих з листя та кореневих бульб <i>S. sonchifolius</i> на функціональний стан лейкоцитів за умов ЕЦД.....	170
3.6.1. Екстракт безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> зумовлює реорганізацію актинового цитоскелету та перерозподіл сіаловмісних глікокон'югатів мембран лейкоцитів.....	170
3.6.2. Екстракти і суспензії <i>S. sonchifolius</i> та безалкалоїдний екстракт <i>G. officinalis</i> модулюють фагоцитарну та метаболічну активність нейтрофілів за умов ЕЦД	180
3.6.3. Безалкалоїдний екстракт <i>G. officinalis</i> регулює проліферацію лейкоцитів за умов ЕЦД.....	190
3.7. Вплив безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> на вміст кінцевих продуктів глікації та їхніх рецепторів у лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету.....	195
3.8. Вплив безалкалоїдного екстракту <i>G. officinalis</i> , а також водних екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб <i>S. sonchifolius</i> на апоптоз лейкоцитів периферичної крові щурів за умов ЕЦД.....	201
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	211
ВИСНОВКИ.....	237
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	240
ДОДАТОК. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА.....	282

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ABTS – 2,2'-азино-біс(3-етилбентіазолін-6-сульфонова кислота

AGEs – кінцеві продукти глікації

ARE – антиоксидант респонсивний елемент

AUC_{glu} – площа під глікемічними кривими

DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор

H₂DCFDA – дихлородигідрофлюоресцеїн діацетат

GPR78 – залежний від глюкози протеїн 78

GSH – відновлений глутатіон

GSSG – окиснений глутатіон

H₂DCF – дихлородигідрофлюоресцеїн

HbA_{1c} – глікований гемоглобін

HSPA5 – протеїн 5 теплового шоку

IKK – ІκB-кіназа

IL – інтерлейкін

iNOS – індукцибельна синтаза оксиду азоту

IRE1 – інозитол-залежний протеїн 1α;

IκB – інгібітор NF-κB

JNK – c-Jun-NH₂-термінальна протеїнкіназа

Keap1 – Kelch-подібний ECH-асоційований протеїн 1

MafA – активатор транскрипції гена інсуліну

MDA5 – протеїн-5 асоційований з диференціюванням меланоми

MEKK3 – кіназа, що активується мітогенами

mTOR – мішень рапаміцину у ссавців

NETs - позаклітинні пастки нейтрофілів

NF-κB – ядерний фактор κB

NO – оксид (II) нітрогену

NOX – NADPH-оксидаза

NPL – лектин нарцису несправжнього

PDX-1 – головний транскрипційний чинник утворення і диференціювання β -клітин

PERK – кіназа ендоплазматичного ретикулума подібна до PKR (протеїн кіназа, що активується дволанцюговою РНК)

PI-3'-K – фосфатидилінозитол-3'-кіназа

PKC – протеїнкіназа C

PNA – лектин насіння арахісу

RAGE – рецептор кінцевих продуктів глікації

RCA – лектин насіння рицини

SDS – додецилсульфату натрію

SCFA – коротколанцюгові жирні кислоти

SNA – лектин бузини чорної

TLR – толл-подібний рецептор

TXNIP – протеїн, що взаємодіє з тіоредоксином

TXNRD1 – тіоредоксинредуктаза1

UHPLC – вискоєфективна рідинна хроматографія

UPR — відповідь на незгорнуті протеїни

UPs – незгорнуті протеїни

WGA – лектин зародків пшениці

АКС – активні карбонільні сполуки

АОА – антиоксидантна активність

АОС – антиоксидантна система

АФН – активні форми нітрогену

АФО – активні форми кисню

БАР – біологічно активні речовини

БіоПАР – біогенні поверхнево-активні речовини

БСА – бичачий сироватковий альбумін

БФЕКЛ – безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського
ГПО – глутатіонпероксидаза
ГР – глутатіонредуктаза
ДТНБК (5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойна кислота) – реактив Елмана
ЕЦД – експериментальний цукровий діабет
ЗФР – забуферений фізіологічний розчин
iNOS – індукцибельна синтаза оксиду нітрогену
ІЗФ – індекс завершеності фагоцитозу
МАО – лектин акації амурської
МАРК – мітоген активована протеїнкіназа
МПО – мієлопероксидаза
МСР-1 – моноцитарний хемотаксичний протеїн 1
ОМП – окисно модифіковані протеїни
ПГТТ – пероральний глюкозотолерантний тест
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
СОД – супероксиддисмутаза
СЦК – середній цитохімічний коефіцієнт
ТБК – тіобарбітурова кислота
ТБК-ПП – ТБК-позитивні продукти
ЦД – цукровий діабет.

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; Mastrogiovanni 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.

Перспективним напрямком у розробці нових ефективних антидіабетичних засобів є пошук препаратів природного походження, які виявлятимуть гіпоглікемічну, антиоксидантну та імуномодулюючу дію і таким чином забезпечуватимуть корекцію метаболічних порушень та імунного статусу для зміцнення опірності організму хворих на ЦД.

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., 2003; 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 є повністю 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 кореневих 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 кореневих 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 імуномодулюючий) екстракту *G. officinalis*, позбавленого алкалоїдів та екстрактів листя і корневих бульб та суспензій корневих бульб *S. sonchifolius*.

Методи дослідження: методи клітинної біології (світлова та флюоресцентна мікроскопія, виділення лейкоцитів, 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 та 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 більш рівномірне 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. Коригуюча 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 і α -D-манози 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 імунокомпетентних клітин крові. Компенсаторною реакцією організму, що виникає у відповідь на зниження кількості лімфоцитів периферичної крові є посилення проліферативної активності кістковомозкових попередників цих клітин. Вперше встановлено здатність досліджуваних фітопрепаратів пригнічувати процес апоптозу лейкоцитів за цукрового діабету. 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 структури 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 цукрового діабету

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 цукрового діабету.

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. Автором особисто проведено пошук та аналіз літератури, розроблено методологію експериментальних досліджень, сформульовано основні положення дисертації, здійснено підготовку рукопису. Експерименти виконані дисертантом особисто або за безпосередньої участі. Планування роботи та обговорення частини отриманих результатів, підготовка деяких рукописів до публікації здійснювались спільно з науковим консультантом, проф. 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 квартилів (**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 імпакт 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми, які залучені до виникнення дисфункції β -клітин підшлункової залози при цукровому діабеті

Серед механізмів, які залучені у розвитку дисфункції та загибелі β -клітин підшлункової залози за умов ЦД, ключовими є стрес ендоплазматичного ретикулума (ER), мітохондріальна дисфункція та оксидативний стрес (Eguchi et al., 2021).

1.1.1. Стрес ендоплазматичного ретикулуму

Станом на сьогоднішній день накопичено значну кількість даних, які підтверджують істотну роль стресу ER (дезадаптивної форми відповіді на місфолдинг) у патогенезі низки захворювань людини, і зокрема, у порушенні функції β -клітин острівців Лангерганса і розвитку ЦД (Eguchi et al., 2021).

Близько 30–50 % від усієї кількості синтезованого білка у β -клітинах підшлункової залози становить проінсулін. При цьому, близько 20 % новосинтезованого проінсуліну не набуває нативної конформації, що свідчить про високу частоту неправильного згортання цього білка в ER (Sun et al., 2015). У відповідь на накопичення незгорнутих протеїнів в ER, і, зокрема, в β -клітинах підшлункової залози, відбувається гіперактивація внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, яку називають «відповіддю на незгорнуті протеїни» (unfolded protein response, UPR). За умов ЦД розвивається, як адаптивна, так і апоптотична UPR, які сприяють або біосинтезу та секреції інсуліну, або апоптозу (Cunha et al., 2008); (Demine et al., 2020).

Причинами стресу ER можуть бути: абсолютна або відносна недостатність шаперонів, дефіциті енергії необхідної для функціонування шаперонів, зміни гомеостазу іонів Ca^{2+} , зміни окисно-відновного

потенціалу, посилений синтез секреторних протеїнів, експресія протеїнів із помилковою конформацією, а також зміни у глікозилюванні протеїнів (Hudish et al., 2019); (Kuok et al., 2019); (Marmugi et al., 2016).

Ідентифіковано три сенсорно-сигнальні системи стресу ER, які розпізнають незгорнуті або неправильно згорнуті білки, які накопичуються в ER: PERK (PRK-like ER kinase), ERN1 (Endoplasmic Reticulum – Nuclei-1) цей ензим також називають IRE1 (Inositol Requiring Enzyme-1) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6). Найважливішою сенсорно-сигнальною системою стресу ER є ERN1.

Ці білки є трансмембранними. Кожен з них містить регуляторний домен, який розміщений в люмені ER і зв'язується з низкою шаперонів, серед них головним є BiP (Immunoglobulin heavy chain binding protein), відомий також як протеїн 78, що регулюється глюкозою (GPR78, Glucose regulated protein), або 70 kDa протеїн 5 теплового шоку (HSPA5).

За умов фізіологічної норми BiP є асоційованим з усіма трьома сигнальними ензимами і відщеплюється тільки за появи в ER незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів, забезпечуючи, таким чином, одночасну негативну регуляцію роботи всіх сигнальних шляхів відповіді на незгорнуті протеїни (Eguchi et al., 2021).

1.1.2. Мітохондріальна дисфункція

Порушення функцій мітохондрій призводить до недостатності енергозабезпечення клітин, порушення інших важливих обмінних процесів, пошкодження клітинних структур та загибелі клітин.

Функціональний стан мітохондрій має вирішальне значення для секреції інсуліну β -клітинами підшлункової залози. Важливу роль у регуляції секреції інсуліну відіграють АТФ-залежні калієві канали (K_{ATP} -канали). У неактивованій β -клітині K_{ATP} -канали відкриті та підтримують негативний електрохімічний потенціал. Секрецію інсуліну стимулює

підвищення концентрації глюкози в крові. Глюкоза потрапляє у β -клітини через глюкозний транспортер GLUT2. Як наслідок посилення метаболізму глюкози у цих клітинах зростає рівень АТФ та знижується рівень АДФ. АТФ зумовлює закриття K_{ATP} -каналів. Мембрана β - клітин деполяризується, це в свою чергу призводить до відкриття потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів. Надходження Ca^{2+} всередину клітини, стимулює екзоцитоз інсулінвмісних секреторних гранул. Цей сигнальний каскад значно змінюється у разі порушення метаболізму в мітохондріях. За умов ЦД знижується глюкозостимульована секреція інсуліну, що пов'язано зі зниженням співвідношення АТФ/АДФ, зниженням потенціалу мітохондріальної мембрани та пригніченням експресії генів, пов'язаних з енергетичним метаболізмом (Anello et al., 2005). Крім того, мітофагія також пов'язана з β клітинною недостатністю при ЦД. Мітофагія забезпечує вибіркове видалення пошкоджених мітохондрій, відтак порушення мітофагії сприяє руйнуванню β -клітин. Цікаво, що рівень мітохондріальної rho GTP-ази 1, PTEN-індукованої putative кінази 1, NIP3-подібного білка X, мітохондріального мембранозв'язаного білка мітофузину 2 і легкого ланцюга білка 3 асоційованого з мікротрубочками, та також експресія важливі гени, пов'язані з мітофагією, підвищується в панкреатичних острівцях пацієнтів з переддіабетом, тоді як значно знижуються в острівцях у пацієнтів із нещодавно діагностованим діабетом та пацієнтів із тривалим діабетом, що вказує на порушення мітофагії при цій патології (Bhansali et al., 2017).

У патогенезі ЦД, окрім мітохондріальної дисфункції, важливу роль відіграє опосередкований мітохондріями апоптоз. Було підтверджено, що АФК, які утворюються в мітохондріях індукують апоптоз шляхом вивільнення цитохрому c у клітинах INS-1 та β -клітинах миші. Іншим механізмом, АФК-індукованого апоптозу, є поділ мітохондрій. Li F та ін. продемонстрували, що АФО, утворені NADPH-оксидазою (NOX)

активованою при обробці β -клітин пальмітатом, активують чутливі до АФО канали з транзиторним рецепторним потенціалом меластатину-2 (TRPM2), що призводить до аномального поділу мітохондрій. Важливо, що закриття чутливого до АФО каналу TRPM2 або обробка клітин антиоксидантом N-ацетилцистеїном у β -клітинах людини запобігає спричиненій пальмітатом загибелі β -клітин і фрагментації мітохондрій, таким чином підкреслюючи важливість АФО у стимулюванні мітохондріальної дисфункції та апоптозу (Seleznev et al., 2006); (Eguchi et al., 2021). Іншим механізмом апоптозу β -клітин, який індукується оксидативним стресом є порушення регуляції антиапоптотичного протеїну Bcl-2 (M. Wang et al., 2012).

1.1.3. Оксидативний стрес

Гіперглікемія, гіперліпідемія і запалення є потужними чинниками, що сприяють утворенню АФО в β -клітинах підшлункової залози. АФО відіграють вирішальну роль у секреції інсуліну на базальному рівні. Льянос та співавтори показали, що рівень АФО та помірне підвищення рівня Ca^{2+} після стимуляції глюкозою необхідний для активації каналу RyR. Після активації ці канали забезпечують підвищення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} , необхідного для секреції інсуліну (Llanos et al., 2015). Більше того, обробка островцевих клітин H_2O_2 при базальному рівні глюкози призводило до збільшення секреції інсуліну, що також підтверджує концепцію, щодо вирішальної ролі АФК у секреції інсуліну. Проте, при патологічних станах накопичення АФО призводить до виникнення оксидативного стресу.

Основним джерелом АФО є мітохондріальний ланцюг транспорту електронів. За умов гіперглікемії і гіперліпідемії підвищені рівні нікотинамід-аденіндинуклеотиду і флавінденіндинуклеотидів є причиною збільшення продукції АФО внаслідок перевантаження ЛТЕ і витік електронів з комплексів I і III. Електрони реагують з молекулярним киснем, утворюючи $\text{O}_2^{\bullet-}$, який швидко перетворюється в H_2O_2 . Відтак, H_2O_2 може

перетворитися у високореакційноздатний гідроксильний радикал і OH^- у ході реакції Фентона за наявності високих концентрацій металів змінної валентності Cu^{2+} і Fe^{2+} (Newsholme et al., 2019).

У β -клітинах є декілька систем антиоксидантного захисту, включаючи каталазу, глутатіонпероксидазу (ГПО), тіоредоксин і пероксиредоксини, які відіграють важливу роль у розщепленні H_2O_2 до H_2O і O_2 . Однак, незважаючи на ці захисні механізми, було продемонстровано, що β -клітини підшлункової залози експресують низькі рівні каталази і ГПО1, що свідчить про високу сприйнятливість до пошкоджуючого впливу АФО. За умов гіперглікемії, в утворенні АФО у β -клітинах залучено активацію протеїнкінази С (РКС), посилене утворення кінцевих продуктів глікації, активацію гексозоамінового й поліолового шляхів та окиснювальне фосфорилування (Robertson, 2004). Гіперліпідемія призводить до підвищення продукції АФО завдяки активації NOX, індукції матричної металопротеїнази 2 (MMP2) та стимуляції інфільтрації β -клітин макрофагами (Sato et al., 2014). На додаток до збільшення продукції АФО, гіперглікемія та гіперліпідемія посилюють окисидативний стрес шляхом зниження антиоксидантної здатності, про що свідчить зменшення співвідношення відновленого та окисненого глутатіону (GSH/GSSG) за умов гіперглікемії та зниження експресії СОД1 та СОД2 при гіперліпідемії у β -клітинах людини та щурів.

1.1.4. Взаємозв'язок між мітохондріальною дисфункцією, стресом ER та оксидативним стресом

На додаток до оксидативного стресу, індукованого гіперглікемією, гіперліпідемією та запаленням, мітохондріальна дисфункція та стрес ER ще більше посилюють утворення АФО. Мітохондріальна дисфункція, яка пов'язана зі збільшенням продукції АФО самою органелою, потенціює оксидативний стрес. Запалення призводить до утворення АФО в

мітохондріях, які в свою чергу активують NF- κ B й NO-синтазу посилюючи оксидативний стрес завдяки порушенню окисно-відновного балансу та утворенню NO. Продукція АФО мітохондріями ще більше посилює оксидативний стрес, сприяючи стресу ER. Стрес ER також індукує утворення АФО і посилює оксидативний фолдинг проінсуліну шляхом активації адаптивного UPR, що збільшує біосинтез і секрецію інсуліну (Broniowska et al., 2015). У процесі згортання проінсуліну утворюються три дисульфідні зв'язки на кожен молекулу синтезованого проінсуліну, при цьому утворюється побічний продукт H_2O_2 . Крім того, стрес ER може індукувати утворення АФО, сприяючи мітохондріальній дисфункції. Витік Ca^{2+} з ER в результаті стресу ER зумовлює порушення Ca^{2+} гомеостазу в мітохондріях та призводить до надпродукції мітохондріальних АФО (Eguchi et al., 2021; Pava, 2012).

Цікаво, що характер взаємодії між стресом ER та мітохондріальною дисфункцією та оксидативним стресом не є односпрямованим. Обробка H_2O_2 острівців Лангерганса людини призводить до підвищення експресії мРНК маркерів стресу ER – CHOP та P581PK. Крім того, було показано, що надпродукція АФО зумовлює виснаження пулу Ca^{2+} в ER, що погіршує функціонування шаперонів у процесі згортання протеїнів і згодом призводить до накопичення неправильно згорнутих протеїнів та стресу ER (Plaisance et al., 2016).

Оксидативний стрес також індукує мітохондріальну дисфункцію. При інкубації клітин лінії INS-1 з H_2O_2 встановлено 4-кратне збільшення рівня АФО, що супроводжувалося зниженням утворення АТФ та потенціалу мітохондріальної мембрани. Обидва ефекти нівелювалися додаванням антиоксиданту. Як зниження рівня АТФ, так і деполяризація мітохондріальної мембрани пов'язані з порушенням секреції інсуліну (Lin et al., 2014).

Чинники навколишнього середовища активують низку сигнальних

шляхів, внаслідок чого утворюються АФО у β -клітинах. Тому вплив оксидативного стресу на β -клітини підшлункової залози є критичним чинником, що визначає їхню долю при ЦД.

1.1.5. Вплив оксидативного стресу на сигнальні шляхи у β -клітинах

Доведено, що оксидативний стрес змінює основні сигнальні шляхи, які є важливими для функціонування та виживання β -клітин. Оксидативний стрес зумовлює активацію АМР-активованої протеїнкінази (АМРК), інгібування рапаміцину (mTOR) у ссавців та активацію N-кінцевої кінази c-Jun (JNK) у β -клітинах підшлункової залози.

Активация АМРК

Сигнальний шлях АМРК відіграє важливу роль у регуляції секреції інсуліну, метаболічних процесів, проліферації та виживанні β -клітин підшлункової залози. За патологічних умов, які супроводжуються оксидативним стресом встановлено активацію АМРК у β -клітинах гризунів та людини (Eguchi et al., 2021).

Активация АМРК зумовлює як захисні, так і ушкоджуючі ефекти. Протекторний вплив АМРК реалізується шляхом інгібування генів mTOR, NOX2, а також збільшення експресії miR184 і поглинання Ca^{2+} . Як наслідок, посилюється аутофагія та секреція інсуліну, а також пригнічується оксидативний стрес та дедиференціяція β -клітин. АМРК також виявляє ушкоджуючі ефекти, опосередковані активацією ERK та інгібуванням mTOR, що призводить до зниження проліферації β -клітин (Ding et al., 2019; Jaafar et al., 2019; Kidder & Montgomery, 1975; Varshney et al., 2017; Xia et al., 2018) .

Відтак, АФО-індукована активация АМРК може сприяти покращенню функції та виживанню β -клітин у короткостроковій перспективі. Проте довготривала активация АМРК негативно впливає на життєздатність і функціональний стан β -клітин. Це може свідчити про те, що на ранніх стадіях ЦД активация АМФК у відповідь на оксидативний стрес слугує захисним

механізмом, натомість, хронічна активація – зумовлює пошкодження β -клітин.

Інгібування mTOR

mTOR – ключовий компонент сигнального шляху, який відіграє важливу роль у підтримці β -клітинної маси шляхом регуляції клітинного циклу, аутофагії, проліферації та апоптозу (Blandino-Rosano et al., 2012). mTORC1, зазвичай, інгібується за умов оксидативного стресу, потенційно через активацію AMPK (M. Wang et al., 2012). Пригнічення регуляції mTOR завдає шкоди β -клітинам, ініціюючи мітохондріальний апоптоз опосередкований через регуляцію тіоредоксин-взаємодіючого білка (TXNIP), індукуючи мітохондріальну дисфункцію, збільшуючи β дедиференціацію клітин і зменшуючи секрецію інсуліну та β проліферацію клітин (Bozadjieva et al., 2017).

Активація JNK/p38

Іншим важливим шляхом, що активується оксидативним стресом у β -клітинах, є шлях JNK. JNK – це MAPK, що активується під дією позаклітинних стресових стимулів. У клітинах β людини та гризунів було продемонстровано кілька дослідженнями, що обробка β клітин продуктами АФК призводить до активації JNK (Zhao et al., 2018). Крім того, вплив на β -клітини людини глюкози та лептину активує JNK та індукує апоптоз (Maedler et al., 2008).

Підвищення регуляції JNK інгібує шлях IRS1/2/P13K, що призводить до інгібування mTOR та ядерної транслокації транскрипційного фактора FOXO1 (forkhead box protein O1). У свою чергу, ядерна транслокація FOXO1 призводить до пригнічення транскрипції Pdx1. Загалом ці ефекти призводять до зменшення кількості β -клітин, зниження секреції інсуліну та посилення дедиференціації інсулінпродукуючих клітин. Окрім того, FOXO1 захищає β -клітини від оксидативного стресу, стимулюючи експресію ензимів АОС ензимів, запобігає дедиференціюванню та підтримує ідентичність β -клітин шляхом пригнічення експресії нейрогеніну-3 (Kitamura, 2013).

Таким чином, розуміння молекулярних механізмів, пов'язаних з

оксидативним стресом, індукованим β -клітинною дисфункцією, може стати основою для нових підходів до лікування ЦД та профілактики його ускладнень.

1.1.6. Антиоксидантний статус β -клітин підшлункової залози

Аналіз експресії генів антиоксидантних ензимів у різних типах клітин острівців Лангерганса підшлункової залози людини свідчить про дефіцит антиоксидантної здатності β -клітин, порівняно з іншими клітинами. У β -клітинах підтвержено найвищу експресію ізоформ СОД1 і СОД2, порівняно з іншими антиоксидантними ензимами. Проте, рівень експресії СОД є в 1,4 рази нижчим, ніж в інших клітинах. Цікаво, що рівень експресії ензимів, які інактивують H_2O_2 , а саме, ГПО і каталази є в 15 та 3 рази нижчим у β -клітинах, порівняно з α -клітинами (Gurgul-Convey et al., 2016). На підтвердження цього свідчить інше дослідження, в якому вивчали антиоксидантний потенціал β -клітин людини у пацієнтів з ЦД 1 і 2 типу, яке показало набагато нижчу експресію каталази і ГПО у β -клітинах, порівняно з α -клітинами. Крім того, встановлено, що за умов ЦД в острівцях Лангерганса підшлункової залози співвідношення β/α клітин значно нижче, порівняно острівцями здорових осіб. Також продемонстровано значно нижчу життєздатність β -клітин при посиленні індукованого оксидативним стресом пошкодження ДНК, порівняно з α -клітинами (Miki et al., 2018). Цікаві дані були отримані Stancill J. et al., які продемонстрували, що за хронічного впливу фізіологічно значущої концентрації H_2O_2 рівнів (50 мкМ) на клітини EndoC- β H1 людини, β -клітини здатні детоксикувати його за участю пероксиредоксинової і тіоредоксинової антиоксидантної системи (Roma & Jonas, 2020; Stancill et al., 2019). Проте, при обробці гідроген пероксидом у концентрації 100 мкМ, β -клітини не здатні його знешкоджувати, що призводить до пошкодження ДНК і зниження їхньої життєздатності. Крім того, у порівнянні з низькою експресією ГПО та каталази, встановлено вищий рівень експресії генів пероксиредоксину, тіоредоксину та тіоредоксинредуктази у β -клітинах мишей та щурів (Stancill et al., 2019). Проте,

це дослідження підтвердило ефект лише фізіологічного рівня H_2O_2 на β -клітинах впродовж 4 год, натомість пролонгований вплив фізіологічних концентрацій H_2O_2 не досліджено.

За умов оксидативного стресу у β -клітинах активується редокс-чутлива сигнальна система Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1)/Nrf2(nuclear E2-related factor 2) /ARE(antioxidant responsive element, 5'-A/GTGAC/TnnnGCA/G-3'), яка відіграє важливу роль у захисті клітин від різних стресових чинників, зокрема, ендогенних та екзогенних окиснювачів. Фактор транскрипції Nrf2 регулює експресію понад 500 генів, у промоторах яких міститься антиоксидант-респонсивний елемент (ARE). Під контролем Keap1/Nrf2/ARE є гени низки антиоксидантних ензимів. Дослідження впливу dh404 – активатора Nrf2 на острівці підшлункової залози людини, виявило посилення регуляції поширених антиоксидантних ензимів, а саме, NAD(P)H: хінооксидоредуктази, гемоксигенази 1 (HO-1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6Pd), сульфоредоксину-1 та тіоредоксинредуктази1 (TXNRD1) (Hudish et al., 2019). Крім того, активація Nrf2 знижувала експресію прозапальних медіаторів і захищала β -клітини людини від оксидативного стресу. Цікаво, що у пацієнтів з предіабетом та ЦД 2 типу TNF- α зумовлював збільшення рівня Nrf2 та зменшення HO-1. Припускають, що у разі посилення оксидативного стресу та запальної реакції, активація Nrf2 та експресія HO-1 були заінгібовані (Masuda et al., 2015). Одним з можливих пояснень зниження активності Nrf2 і HO-1 є порушення регуляції сигнального шляху PI3K/АКТ за умов оксидативного стресу (Zhu et al., 2020).

Оксидативний стрес відіграє вирішальну роль в індукції дисфункції та загибелі β -клітин зумовлюючи зміни важливих сигнальних шляхів, які регулюють функції β -клітин. Крім того, здатність оксидативного стресу впливати на апоптотичний UPR за умов стресу ER та у разі реалізації мітохондріального шляху апоптозу підкреслює його деструктивну роль в об'єднанні різних патогенетичних шляхів для подальшого посилення

руйнівного стану β -клітин. Таким чином, фармакологічне втручання, спрямоване на підвищення антиоксидантної здатності β -клітин, відіграватиме важливу роль у збереженні цих ендокриноцитів за умов ЦД.

1.2. Лейкоцити та їхня роль в етіопатогенезі цукрового діабету 1 типу

ЦД 1 типу – це автоімунне захворювання, яке розвивається внаслідок руйнування критичної кількості інсулін-продукуючих β -клітин підшлункової залози і зумовлене генетичними чинниками та чинниками навколишнього середовища. Ініціація і прогресування захворювання передбачає складну взаємодію між β -клітинами та клітинами вродженого і адаптивного імунітету. Добре відомо, що клітини імунної системи, а саме, Т-клітини, макрофаги і дендритні клітини відіграють вирішальну роль у патогенезі ЦД 1 типу. Дослідження останніх років підтверджують, що нейтрофіли є важливими ефекторними клітинами вродженої імунної відповіді, які беруть участь в ініціації гострої фази запалення при ЦД 1 і 2 типів. Вони можуть накопичуватися у підшлунковій залозі та інсуліночутливих тканинах і чинити істотний вплив на виникнення і розвиток ЦД 1 типу. Цитотоксичні речовини, які виділяють нейтрофіли, зокрема, продукти дегрануляції, цитокіни, АФО та позаклітинні пастки, які вивільняються в процесі дозрівання або активації нейтрофілів, можуть зумовлювати деструкцію острівцевих клітин.

1.2.1. Функції нейтрофілів при ЦД 1 типу

У цитоплазмі нейтрофілів є гранули трьох типів (азурофільні, специфічні, желатиназні), які містять різні антимікробні білки, пептиди та ензими, за допомогою яких ці клітини знищують фагоцитовані бактерії. Окрім цих класичних гранул, нейтрофіли містять секреторні везикули, які добре мобілізуються, і слугують резервуаром головним чином для рецепторів плазматичної мембрани. Майже одночасно з дегрануляцією, із затримкою

приблизно 20 с відбувається активація НАДФН-оксидази та утворюються АФО. Крім того, активовані нейтрофіли можуть залучатися в NETозис і екструдувати позаклітинні фібрилярні мережі, які називаються позаклітинними пастками нейтрофілів (NET) (J. Huang et al., 2016). Крім того, ці клітини можуть ініціювати діабетогенну відповідь Т-клітин і сприяти розвитку ЦД 1 типу через клітино-клітинні взаємодії з іншими імунними та неімунними клітинами.

Клінічні дослідження та експериментальні дослідження на тваринних моделях підтверджують дефекти хемотаксису нейтрофілів та адгезивної здатності (Dinauer, 2020; Huang et al., 2016) (табл. 1).

Таблиця 1

Кількісні та функціональні показники нейтрофілів при ЦД 1 типу

Кількість і функції нейтрофілів	Зміни
Кількість нейтрофілів	Підвищується
	Знижується
Хемотаксис	Без змін
Адгезія	Знижується
Мікробовищна активність	Знижується
Респіраторний вибух	Знижується
	Посилюється
Міграція	Підвищується
	Знижується
Фагоцитоз	Без змін
	Знижується
Апоптоз	Посилюється

Таким чином, станом на сьогоднішній день літературні дані щодо захисних функцій нейтрофілів, а саме, респіраторного вибуху, міграційної здатності, фагоцитозу, а також апоптозу є суперечливими. Змінені функції

нейтрофілів можуть бути зумовлені підвищеною експресією адгезивних молекул, зниженою експресією рецепторів, порушенням сигналізації кальцію й аномальною активністю аденозинтрифосфатсинтаз нейтрофілів (J. Huang et al., 2016; Spiller et al., 2012; Vinten-Johansen, 2004). Хоча швидкість апоптозу нейтрофілів значно корелювала з рівнем глікованого гемоглобіну (HbA1c) у пацієнтів з ЦД 2 типу, дослідження показали, що рівень HbA1c не впливає на функції нейтрофілів у пацієнтів з ЦД 1 типу (Sudo et al., 2007). Існує безліч доказів, які підтверджують вплив факторів навколишнього середовища, таких як гіперглікемія і кінцеві продукти глікації (AGEs) на функції нейтрофілів, проте літератури щодо зв'язку нейтрофільної дисфункції і генів мало (J. Huang et al., 2016).

Нейтрофіли, конститутивно або після стимуляції, не тільки синтезують різноманітні поліпептиди, які безпосередньо беруть участь в їхніх ефекторних функціях, але також можуть продукувати численні білки – модулятори запалення (Cassatella, 1999). Серед цих молекул ключовими ефекторами є цитокіни з огляду на їхню різноманітну біологічну активність (Cassatella, 1999; Tecchio et al., 2014). Хоча нейтрофіли продукують значно менше цитокінів, ніж інші імунні клітини, вони становлять більшість інфільтруючих клітин у вогнищах запалення і є джерелом цитокінів у цих тканинах. Широкий спектр біологічної дії цитокінів, підтверджує вирішальний вплив нейтрофілів не тільки на запальну реакцію, але і на вроджений та адаптивний імунітет (Cassatella, 1999; J. Huang et al., 2016). Доведено, що цитокіни, які утворюються локально в островцях і навколо островців у разі інсуліту, відіграють важливу роль у розвитку аутоімунного діабету (Rabinovitch, 1998). Цитокіни, а саме, TNF- α , IL-1, IFN- γ і TNF- β , стимулюють продукцію АФО, які зумовлюють руйнування β -клітин підшлункової залози. Також IL-1, секретований макрофагами зумовлює порушення функції β -клітин та зниження їхньої кількості. Незважаючи на широку різноманітність і біологічну активність цитокінів які секретують

нейтрофіли, їхня роль у патогенезі аутоімунного діабету й досі повністю незрозуміла.

1.2.2. Міжклітинні взаємодії при ЦД 1 типу

Нейтрофіли беруть участь у складних взаємодіях з більшістю імунних клітин інших типів і забезпечують їхню активацію, дозрівання і ефektorні функції прямо або опосередковано (Jaillon et al., 2013). Вони інструктують інші імунні клітини шляхом секреції цитокінів, вмісту гранул і АФО.

Нейтрофіли є головними імунними клітинами, які посилюють запальний процес (Talukdar et al., 2012). Взаємодії між β -клітинами підшлункової залози та нейтрофілами, а також іншими імунними клітинами у разі аутоімунного діабету 1 типу, відіграють значну роль у прогресуванні захворювання. Нещодавно Diana та співавторами (Diana et al., 2013) було встановлено, що фізіологічна загибель β -клітин може бути індукована залученням і активацією нейтрофілів, В-1а лімфоцитів та плазмоцитоїдних дендритних клітин у молодих мишей NOD. Взаємодія між цими клітинами вродженого імунітету відбувається в підшлунковій залозі та ініціює розвиток ЦД 1 типу. Вони також виявили ще один новий перехресний зв'язок між макрофагами та β -клітинами підшлункової залози, який відповідає за інфільтрацію нейтрофілів у підшлунковій залозі під час початкової фази аутоімунного діабету (Diana & Lehen, 2014).

Фізіологічну загибель β -клітин розглядають як пусковий механізм у розвитку ЦД, який може рекрутувати та активувати клітини імунної системи, зокрема нейтрофіли, для проникнення в острівці підшлункової залози. У підшлунковій залозі нейтрофіли вивільняють зв'язаний з кателіцидином антимікробний пептид (CRAMP). Процес вивільнення активується ДНК-специфічними імуноглобулінами G, що секретуються В-1а лімфоцитами. Ці імуноглобуліни G і пептидний комплекс CRAMP разом із уламками β -клітин, можуть зумовлювати індукцію плазмоцитоїдними дендритними клітинами інтерферону- α . Такий перехресний зв'язок між цими імунними клітинами є

необхідним для індукції діабетогенної відповіді Т-лімфоцитів, і призводить до ініціації ЦД 1 типу. Крім того, передбачають, що взаємодія між нейтрофілами та іншими неімунними клітинами, зокрема, з тромбоцитами крові або ендотеліальними клітинами судин, відіграє важливу роль у діабетичних мікро- та макросудинних ускладненнях. І навпаки, нейтрофіли можуть активуватися та зазнавати пошкоджень внаслідок метаболічних порушень за ЦД 1 типу.

Існують переконливі докази того, що Т-лімфоцити відіграють важливу роль у розвитку ЦД 1 типу. На ранній стадії діабету CD8⁺ Т-лімфоцити є найчисленнішим типом імунних клітин, які інфільтрують підшлункову залозу при інсуліті (Willcox et al., 2009). Вони можуть зумовлювати адаптивні імунні реакції та пошкоджувати β-клітини підшлункової залози за участю молекул головного комплексу гістосумісності класу I, а також CD4⁺ та CD8⁺ Т-лімфоцити можуть секретувати цитокіни, які прямо чи опосередковано сприяють апоптозу β-клітин (Diana & Lehuen, 2014).

У мишей з NOD інфільтрація нейтрофілами острівців підшлункової залози головно регулюється лігандами CXCR2, нейтрофіли рекрутуються хемокінами CXCL1 і CXCL2, які утворюються β-клітинами і макрофагами. Блокування CXCR2 на ранніх стадіях може призвести до різкого зниження специфічних CD8⁺ Т-клітин всередині острівців, та пригнічувати діабетогенну Т-клітинну відповідь, а відтак, розвиток діабету (Lehuen et al., 2010).

Нещодавно було виявлено знижену експресію РНК Sxcr1 як у нейтрофілах, так і в CD4⁺ Т лімфоцитах, виділених у мишей з NOD порівняно з мишами, стійкими до діабету. Низька експресія Sxcr1 у мишей з NOD може сприяти патогенезу аутоімунного діабету (Naurogné et al., 2015). Крім того, IL-17⁺ β-клітинно-специфічні аутореактивні CD4⁺ Т-клітини виявляють у крові пацієнтів з діабетом 1 типу при діагностиці (Arif et al., 2011). Цей прозапальний цитокін IL-17 в підшлунковій залозі може залучати нейтрофіли для проникнення в тканину підшлункової залози (Battaglia, 2014). Отже,

нейтрофіли, як і Т-лімфоцити можуть впливати на патогенез ЦД 1 типу з різним ступенем синергізму.

Макрофаги і β -клітини рекрутують нейтрофіли, які експресують CXCR2, виробляючи хемокіни CXCL1 і CXCL2 (Diana & Lehen, 2014; J. Huang et al., 2016). Блокування нейтрофілів антагоністами CXCR2 може пригнічувати діабетогенну Т-клітинну відповідь і послаблювати подальше прогресування аутоімунного діабету. Також доведено, що адгезія нейтрофілів до ендотеліальних судин підшлункової залози є важливою подією у розвитку запального процесу і є одним з важливих кроків в ініціації аутоімунного діабету. Відтак, блокування різних адгезійних молекул, а саме, селектинів та інтегринів (L-селектин, VLA-4 і LFA-1), експонованих на нейтрофілах специфічними антагоністами, може бути ефективним підходом для зменшення міграції нейтрофілів до вогнища запалення у підшлунковій залозі та пригнічення руйнування β -клітин (Burkly et al., 1994; J. Huang et al., 2016; Nipova et al., 2004). Однак відомо, що молекули адгезії експресуються не тільки на нейтрофілах, але і на лімфоцитах, моноцитах і природних клітинах-кілерах (Dunne et al., 2003).

Таким чином, механізм ініціації та патогенез ЦД 1 типу досі залишається незрозумілим. Проте, аналіз літературних джерел за останні десятиліття показує, що нейтрофіли відіграють важливу роль у виникненні та прогресуванні аутоімунного діабету 1 типу. Нещодавні відкриття дали нове уявлення про роль нейтрофілів на початковій стадії захворювання. Виявлено, що нейтрофіли можуть індукувати діабет 1 типу завдяки проникненню в острівці підшлункової залози та шляхом взаємодії з іншими імунними клітинами. Проте, лише дуже незначна кількість досліджень пояснює взаємозв'язок між нейтрофілами і діабетом, хоча нейтрофіли, як найпоширеніший тип клітин в кровообігу першими мігрують до місця запалення.

1.3. Антидіабетичний потенціал біологічно активних речовин лікарських рослин

Інсулін та синтетичні пероральні гіпоглікемічні препарати (сульфонілсечовина та інші секретагоги, бігуаніди, інгібітори α -глюкозидази, тіазолідиндіони), які використовують для лікування ЦД, нездатні повністю компенсувати метаболічні та функціональні порушення, які розвиваються при цьому захворюванні. Тривалі ін'єкції інсуліну призводять до інсулінорезистентності і зменшують його ендогенний синтез в організмі, посилюючи залежність пацієнта від інсуліну (Yaribeygi et al., 2020). До того ж, у разі тривалого застосування пероральних гіпоглікемічних препаратів розвивається резистентність до цих лікарських засобів та виникають побічні ефекти (Watt et al., 2019; Wu & Ballantyne, 2020). Відомо, що похідні сульфонілсечовини втрачають свою ефективність після 6 років лікування приблизно у 44 % пацієнтів (X. Li et al., 2022). З огляду на це, рослині джерела біологічно активних сполук стають дедалі популярнішими серед вчених, дослідників і фармацевтичних компаній, оскільки можуть слугувати основою нових антидіабетичних препаратів з мінімальними побічними ефектами. До того ж, фітопрепарати є дешевшою альтернативою синтетичних препаратів.

Згідно даних ВООЗ, у всьому світі використовують близько 21 000 лікарських рослин у лікувальних цілях, з них, понад 400 рослин використовують для лікування ЦД (Kumar et al., 2021). Проте, лише невелика кількість цих рослин пройшла наукову та медичну оцінку їхньої ефективності. (Durazzo et al., 2018).

1.3.1. Механізми антидіабетичної дії біологічно активних речовин лікарських рослин

Лікарські рослини містять широкий спектр фітохімічних речовин, включаючи алкалоїди, фенольні кислоти, флавоноїди, глікозиди, сапоніни,

полісахариди, стилібени та танін, які інтенсивно досліджуються на предмет їхньої антитидіабетичної дії.

Антидіабетична дія фітохімічних сполук реалізується різними механізмами, а саме, завдяки регуляції метаболізму глюкози та ліпідів, секреції інсуліну, протекторному впливу на β -клітини підшлункової залози, активації сигнального шляху *NF-kB*, інгібуванню ензимів гліоконеогенезу, а також опосередковується антиоксидантною дією (Salehi et al., 2019).

Алкалоїди

В експериментах *in vitro* та *in vivo* підтверджено вплив алкалоїдів берберину, тригонелліну, піперину, оксиматрину, віндонеліну, еводіаміну та неферину на сигнальні шляхи інсуліну та пов'язані з ними каскади у β -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози, міоцитах, адипоцитах, гепатоцитах та інших клітинах (Christodoulou et al., 2019).

Берберин – алкалоїд ізохінолінового класу, виділений барбарису (*Berberis* L.). Берберин інгібує активність α -глюкозидази та пригнічує всмоктування глюкози через кишковий епітелій (Salehi et al., 2019). До того ж, берберин виявляє потужні антиоксидантні, протизапальні, гіпоглікемічні та гіполіпідемічні властивості (Cicero & Baggioni, 2016).

Болдин – алкалоїд класу бензилізохіноліну, виділений з чилійського дерева болдо (*Peumus boldus*). Болдин покращує функцію ендотелію у мишей з діабетом db/db інгібуючи індуковане прозапальним цитокіном BMP4 (англ. Bone morphogenetic protein 4) утворення АФО. BMP4 погіршує функцію ендотелію в аорті мишей або шляхом надпродукції АФО за участю NADPH-оксидази, або завдяки активації циклооксигенази-2. Болдин модулює редокс-чутливі механізми, зокрема, зменшуює рівень АФО шляхом інгібування експресії BMP4 (Lau et al., 2013).

Лупанін є алкалоїдом хінолізидину, виділеним з видів *Lupinus*, зокрема з *Lupinus perennis*. Він посилює секрецію інсуліну. Нещодавно Wiedemann et al.

показали, як лупанін покращує гомеостаз глюкози, впливаючи на АТФ-чутливі калієві канали (Wiedemann et al., 2015).

Флавоноїди

Завдяки наявності гідроксильних груп і ароматичних кілець у структурі флавоноїдів, їм притаманні антиоксидантні властивості. Доведено антидіабетичні властивості низки флавоноїдів, таких як катехіни, фізетин, кемпферол, лютеолін, нарингенін, кверцетин, рутин, морін, силімарин, хризин, байкалейн, ікарийн, ізоліквірітигенін, діосмін, ізоангустон А, геністеїн та інші. У роботі Den Hartogh і Tsiani (Den Hartogh & Tsiani, 2019) добре узагальнено результати досліджень антидіабетичної дії нарингеніну *in vitro* та *in vivo*. Показано, що нарингенін пригнічує всмоктування глюкози у кишківнику, знижує ниркову реабсорбцію глюкози та збільшує утилізацію глюкози м'язовою та жировою тканинами. Застосування нарингеніну знижує продукцію триацилгліцеролів та пригнічує глюконеогенез у печінці (Den Hartogh & Tsiani, 2019).

Експериментально підтверджено захисні ефекти катехінів (катехін, епікатехін і галлат епігаллокатехіну) за умов оксидативного стресу, а саме підвищення активності супероксиддисмутази, глутатіон-S-трансферази і каталази.

Хлорогенова, ферулова і кавава кислоти, кверцетину моноглюкозид, катехіни гальмують SGLT-1-опосередкований транспорт глюкози в кишківнику. Транспорт глюкози за допомогою GLUT-2 інгібується кверцетином, мірицетином, апігенином та катехінами чаю (Salehi et al., 2019). Флавоноїд фізетин, який міститься у складі різноманітних рослин, знижує рівень глюкози в крові завдяки інгібуванню ензимів глюконеогенезу (Den Hartogh & Tsiani, 2019).

Флавоноїди (кверцетин, лютеолін і апігенін) впливають на секрецію інсуліну шляхом посилення проліферації β -клітин. Також флавоноїди

відновлюють секрецію інсуліну запобігаючи цитокін-індукованому пошкодженню β -клітин (AL-Ishaq et al., 2019).

Встановлено, що представник антоціанів – ціанідин-3-О-глюкозид, виділений з чорної квасолі, підвищує чутливість клітин різних тканин до інсуліну, рівень глюкози, вільних жирних кислот і триацилгліцеролів у крові, а також прозапальних цитокінів ФНП- α та ІЛ-6. Також ціанідин-3-галактозид інгібує активність α -амілази та α -глюкозидази, що пригнічує засвоєння багатьох цукрів. Антоціани чорниці знижують чутливість клітин до інсуліну шляхом активації AMP-активованої протеїнкінази, яка регулює процеси β -окиснення жирних кислот і транслокацію GLUT4 до плазматичної мембрани (Takikawa et al., 2010).

Інгібування активності ензимів, що беруть участь у процесі перетравлення вуглеводів, зокрема α -амілази і α -глюкозидази зумовлює повільніше надходження вуглеводів у кров, і як наслідок зниження потреби інсуліну. Встановлено виражену інгібуючу дію антоціанідинів, ізофлавононів і флавононів на активність α -глюкозидази у дріжджів. Активність α -глюкозидази тонкого кишківника щурів інгібують флавоноїди, а також антоціаніди та ізофлавонони (Tadera et al., 2006). Окрім того, флавоноїдний глікозид кверцетин 3-О- β -D-ксилопіранозил - (1 $\rightarrow$ 2) - β -D-галактозид інгібує активність мальтази (Jong-Anurakkun et al., 2007).

Флавонон хризоееріол 6-С- β -фукопіранозид виділений з приймочок кукурудзи (*Zea mays*) пригнічує утворення кінцевих продуктів глікації (Suzuki et al., 2007).

Доведено, що флавоноїд рутин виділений з рути запашної (*Ruta graveolens*) підвищує експресію рецептора PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptors*), що призводить до підвищення периферичного поглинання глюкози завдяки підвищенню транслокації GLUT-4 в адипоцитах (Chemler et al., 2007; Hsu et al., 2014).

Ізофлавоїни, відомі як фітоестрогени, також виявляють антидіабетичну дію активуючи сАМР/РКА сигнальний каскад, що призводить до підвищення концентрації Ca^{2+} і секреції інсуліну (Fu & Liu, 2009).

Терпеноїди

Природний тритерпен целастрол є інгібітором NF- κ B, а також покращує інсулінорезистентність та зменшує пошкодження нирок (Govindarajan et al., 2010). Олеанолова кислота – пентациклічний тритерпеноїд, знижує гіперглікемію шляхом Akt/FoxO1-індукованого пригнічення гліоконеогенезу у печінці мишей (Okokon et al., 2006). Інший пентациклічний тритерпеноїд – урсолова кислота, безпосередньо інгібує РТР1В і покращує чутливість до інсуліну (Bayat et al., 2016).

Інші

Експериментально підтверджено багатоцільові антидіабетичні ефекти ресвератролу, а саме зниження рівня глюкози, покращення чутливості до інсуліну, посилення транслокації GLUT-4, пригнічення оксидативного стресу, протекторний вплив на β -клітини підшлункової залози, покращення секреції інсуліну. Антигіперглікемічні ефекти ресвератролу пов'язані з зі здатністю ресвератролу підвищувати експресію/активність АМРК та SIRT1 у різних тканинах хворих на ЦД (Öztürk et al., 2017; Szkudelski & Szkudelska, 2015).

Хлорогенова кислота – це природний поліфенол, який міститься в багатьох різновидах видів рослин. Він стимулює поглинання глюкози клітинами скелетних м'язів за допомогою активації АМРК (Ong et al., 2013).

Антидіабетичний ефект елагової кислоти пов'язують з її впливом на β -клітини підшлункової залози, що стимулює секрецію інсуліну, антиоксидантною дією та інгібуючим впливом на активність α -амілази. Елагова кислота знижує гіперглікемію та резистентність до інсуліну при ЦД 2-го типу (Fatima et al., 2017).

1.3.2. Лікарські рослини *G. officinalis* та *S. sonchifolius* – потенційні джерела біологічно активних речовин з антидіабетичною дією

Серед понад 1000 видів рослин, які використовують як антидіабетичні засоби, особливої уваги заслуговує козлятник лікарський (*Galega officinalis* L.) – багаторічна рослина родини бобових (*Fabaceae*) (Delaviz et al., 2017). З лікувальною метою використовують надземну частину та насіння рослини (у разі повного достигання). Траву збирають під час масового цвітіння, висушують під наметом або в сушарці при температурі до 40° С і зберігають у сухому приміщенні (з 4 кг сирої трави отримують 1 кг сухої).

Доступною національною сировинною базою *G. officinalis* є Дослідна станція лікарських рослин Інституту агроєкології і природокористування НААН України (с. Березоточа, Лубенський район, Полтавська область).

Ранні фармакологічні дослідження показали, що надземна частина *G. officinalis* виявляє гіпоглікемічну активність. При цьому зниження рівня глюкози пояснювали наявністю в сировині похідних гуанідину, а саме алкалоїдів галегіну та гідроксигалегіну (Susag et al., 2003). Галегін став основою для синтезу метформіну (1,1-диметилбігуаніду), 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 і оцінені в традиційній медицині, вивченню фітохімічного профілю трави *G. officinalis* приділено недостатньо уваги. Повідомляють про інші групи фітохімічних речовин, які містяться у складі *G. officinalis*, а саме, флавоноїди, терпени, сапоніни, жирні кислоти, фітоестрогени, амінокислоти, вітаміни, тощо.

У складі *G. officinalis* виявлено низку флавоноїдів, а саме, кемпферол, 3,5,8,3',4'-пентаоксифлавіон, лютеолін, лютеолін-5-глікозид, пентаоксифлавіон-5-глікозид, нортерпеноїдний глікозид та два флавонові триглікозиди –

маурітіанін і кверцетин (Ковальов В.М. et al., 1985; Лапиніна Л. А., 1965; Champavier et al., 2000). Кверцетин і кемпферол відомі антиоксидантними властивостями. Кверцетин запобігає утворенню вільних радикалів, інгібує процеси ПОЛ, підвищує рівень глутатіону, а також захищає β -клітини від окисного пошкодження та сприяє секреції інсуліну через сигнальний шлях ERK1/2 у клітинах INS-1 (Youl et al., 2010). Крім того, цей флавоноїд знижує активність прозапальних ензимів і рівень цитокінів (Chen et al., 2016). Також показано, що кверцетин у дозах 10 та 20 мкМ пригнічує синтез COX-2 і PGE₂ впливаючи на PI3K у RLE-клітинах (Lee K. M. et al., 2010). Водночас, кверцетин позитивно впливає на метаболізм вуглеводів та ліпідів у щурів за умов ЦД. У дозах 10, 50 і 100 мкМ кверцетин блокує адипогенез, стимулюючи сигнальний шлях мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK), і індукує апоптоз зрілих адипоцитів, контролюючи шляхи ERK і JNK у преадипоцитах 3T3-L1 (Ahn et al., 2008; Chen et al., 2016). При пероральному застосуванні у дозі 30 мг/кг протягом 30 днів кверцетин значно знижував рівень глюкози в крові, підвищував рівень інсуліну та покращував антиоксидантний статус щурів з діабетом завдяки пригніченню процесів ПОЛ та підвищення активності антиоксидантних ензимів (Babujanathan et al., 2011).

Кемпферол стимулює синтез глікогену за участю PI3K, GSK-3, MAPK і PP1 (Cazarolli et al., 2009). В адипоцитах 3T3-L1 кемпферол у дозах 5, 10, 20 і 50 мкМ покращував стимульоване інсуліном засвоєння глюкози (Fang et al., 2008). Андіабетична дія кемпферолу визначаються його здатністю впливати на життєздатність β -клітин підшлункової залози. Встановлено, що кемпферол у дозі 10 мкМ захищає β -клітини посилюючи експресію протеїнів Akt і Bcl-2 (Y. Zhang & Liu, 2011). Окрім того, показано, що кемпферол індукує аутофагію. Індукована кемпферолом аутофагія, сприяє внутрішньоклітинній деградації ліпідів, знижує стрес ЕПР і захищає β -клітини від ліпотоксичного пошкодження (Ashrafizadeh et al., 2020). Встановлено, що кемпферол взаємодіє з мітохондріальним фактором елонгації трансляції Tu (TUFM, Tu translation

elongating factor mitochondrial). TUFM підсилює взаємодію між комплексами ATG12–ATG5, тим самим сприяючи утворенню аутофагосом і лізосом.

Гіпоглікемічну дію кемпферолу пов'язують з його стимулюючим впливом на секрецію інсуліну. У дослідженні з використанням глібенкламіду, секретагога інсуліну, показано, що кемпферол підвищує рівень інсуліну в плазмі крові і знижує рівень глюкози в крові у щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом (Al-Numair et al., 2015). Регуляція секреції інсуліну і метаболізму глюкози відбувається за участю Ca^{2+} . Мітохондріальний монопортер кальцію (MCU, Mitochondrial calcium monporter) є основним транспортером, який забезпечує поглинання Ca^{2+} мітохондріями (Alevriadou et al., 2021; Georgiadou & Rutter, 2020). Кемпферол безпосередньо активує MCU. За концентрації 1 мкМ кемпферол майже удвічі збільшує поглинання мітохондріального Ca^{2+} . Надходження Ca^{2+} у мітохондрії за участю MCU відіграє ключову роль у продукції АТФ у β -клітинах, як *S. sonchifolius*.

Антиоксидантна дія кемпферолу зумовлена його здатністю нейтралізувати гідроксильні радикали та пероксинітрит, підвищувати експресію або активність антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази, гемоксигенази-1) та пригнічувати активність ензимів, що продукують АФО, зокрема, ксантиноксидази. (Lee Y. J. et al., 2010; Calderon-Montano et al., 2011). Окрім того, кемпферол виявляє протизапальну дію за допомогою різних механізмів, а саме, пригнічуючи активацію транскрипційних чинників NF- κ B, AP-1 та прозапального цитокіну TNF- α (Calderon-Montano et al., 2011, Gopalakrishnan et al., 2006), а також активність ензимів, що беруть участь у синтезі ейкозаноїдів при запаленні (COX, LOX та iNOS) (Calderon-Montano et al., 2011). У дослідженнях *in vivo* кемпферол у дозах 50 та 150 мг/кг пригнічував розвиток запалення у печінці шляхом зниження регуляції експресії IKK та інгібування сигнального шляху NF- κ B (Luo et al., 2015).

Ще однією перспективною рослиною, яка є джерелом цінних БАР є якон (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. et Endl.) Н. Robinson, синонім *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl., *Polymnia edulis* Wedd.). *S. sonchifolius* – рослина родини Айстрові (Asteraceae). Якон – рідкісна для Європи культура, її традиційно вирощують у північних і центральних Андах від Колумбії до північної Аргентини. В Україні розпочато інтродукцію якона у 2009-2011 рр. (Київська та Полтавська області). Досліджено компонентний яклад якона української інтродукції. (Міщенко Л. Т., 2012; Dashchenko et al., 2016; Marchyshyn, S, et al., б. д.).

Головною цінністю кореневих бульб *S. sonchifolius* як джерела біологічно активних речовин є наявність у їхньому складі β -(2-1)-фруктоолігосахаридів (олігофруктани інулінового типу), які сповільнюють всмоктування моносахаридів у ШКТ (Simonovska et al., 2003).

ФОС сприяють росту корисних для здоров'я людини мікроорганізмів, одночасно пригнічуючи ріст патогенних бактерій. Оскільки ФОС не перетравлюються у ШКТ людини, у товстій кишці вони піддаються розщепленню ензимами до коротколанцюгових жирних кислот (SCFA, short certain fatty acid) – ацетату, пропіонату та бутирату), лактату, вуглекислого газу та водню окремими видами кишкової мікробіоти, особливо *біфідобактеріями* та *лактобактеріями*. SCFA швидко всмоктуються в товстій кишці та транспортуються у кров, де вони відіграють свою фізіологічну роль як субстрати або сигнальні молекули в регуляції імунної відповіді, гомеостазу глюкози та метаболізму ліпідів (Caetano et al., 2016). Показано, що ацетат знижує рівень вільних жирних кислот (ВЖК) у плазмі крові. ВЖК спричиняють периферичну резистентність до інсуліну у осіб з ожирінням, пригнічуючи поглинання глюкози та синтез глікогену (Fernandes et al., 2012). Встановлено, що у разі перорального введення пропіонату як здоровим, так і діабетичним тваринам відмічено пригнічення глюконеогенезу шляхом збільшення експресії AMPK у печінці (Boillot et al., 1995). Також повідомлялося, що SCFA впливає на рівень глікемії через пептид

кишкових гормонів YY (PYY) і GLP-1, безпосередньо активуючи рецептори вільних жирних кислот у товстій кишки 2 і 3 (Ffar2 і Ffar3) (Psichas et al., 2015).

Окрім того, ФОС можуть також безпосередньо виявляти модулюючу дію на імунну систему через кишково-асоційовану лімфоїдну тканину, а не мікробіоту кишківника (Peshev & Van den Ende, 2014). Природні рослинні сполуки, такі як флавоноїди та полісахариди, можуть активувати спеціалізовані клітини імунної системи (макрофаги, дендритні клітини, лімфоцити та нейтрофіли), імітуючи патоген-асоційовані молекулярні патерни, які зв'язуються з Toll-подібними рецепторами (TLR), спричиняючи імуномодулюючі ефекти (Liu et al., 2011). Показано, що вживання якона збільшувало продукцію цитокінів (IL-10, IFN- α та IL-4) та експресію Toll-подібних рецепторів 4 (TLR4) та CD206 у клітинах новонароджених мишей (Choque Delgado et al., 2013; Velez et al., 2013). Збільшення експресії цих рецепторів у кишково-асоційованих імунних клітинах призводить до покращення стану вродженої імунної відповіді з високою активністю макрофагів.

До групи фенолів належать хлорогенова кислота, протокатехова кислота, п-кумарова кислота, ферулова кислота та похідні кавової кислоти (Ferraz et al., 2020; Lachman et al., 2003a; Valentova et al., 2016). Фенольні кислоти мають високий антиоксидантний потенціал завдяки наявності в молекулі ароматичного кільця, карбоксильної групи та однієї або декількох гідроксильних та/або метоксильних груп (Pereira et al., 2016). Бульби якону були ідентифіковані як джерело флавоноїдів, включаючи кверцетин і деякі неідентифіковані флавоноїди (Simonovska et al., 2003; Valentova et al., 2016).

Найпоширенішою амінокислотою у кореневій частині рослини є триптофан, відомий як попередник серотоніну та мелатоніну. Хлорогенова кислота і триптофан були ідентифіковані, як два основних антиоксиданти коренів якону (Yan et al., 1999).

Якон є багатим джерелом антиоксидантів. Листя *S. sonchifolius* містить флавоноїди, такі як лютеолін 3',7-О-диглюкозид і лютеолін 7-О-глюкозид, апігенін і лютеолін, 5,7-дигідрокси-4'-метоксифлавонол, 5,7,3'-тригідрокси-4'-метоксифлавонол, 5-гідрокси-4'-метокси-7-О-глікосилфлавонол і 7,4'-дигідрокси-3,5'-диметоксифлавонол (Aguilar F. & Bonilla R., 2009; Honore & Genta, 2015). Що стосується вмісту фенолів і фенолкарбонових кислот, то частини якону можна розташувати в такому порядку: кореневища > листя > стебла > бульбоподібні корені (Nagaliyevska et al., 2021). Той факт, що не тільки листя якону, але і його коренева частина багаті антиоксидантами, цінний для пошуку ефективних засобів проти гіперглікемії.

У листі якона міститься низка сквітерпенових лактонів (Valentova et al., 2016). Основним лактоном листя якону є енгідрин, який має протидіабетичні властивості (Barcellona et al., 2012). Показано, що сесквітерпенові лактони пригнічують продукцію NO в стимульованих ліпополісахаридом клітинах мишачих макрофагів RAW 264.7 (Hong et al., 2008). Сесквітерпенові лактони також можуть регулювати імунну відповідь. Енгідрин і увелелін інгібують NF-κB, транскрипційний фактор, який відіграє центральну роль у транскрипції генів, пов'язаних із запальним процесом (Oliveira et al., 2013). Енгідрин, увелелін і сонхіфолін пригнічували проліферацію клітин і індукували апоптоз в клітинах раку шийки матки. Їх апоптотичний ефект пов'язаний з активацією каспази-3/7 та інгібуванням NF-κB (Siriwan et al., 2011).

Основними ненасиченими жирними кислотами, що містяться в екстрактах листя якону, були гамма-ліноленова (ω-6), ейкозапентаєнова (ω-3) і лінолева (ω-6) кислоти. Крім того, в цій частині рослини виявлені лауринова, міристинова, пентадеканоєва, пальмітинова, пальмітолеїнова, маргарінова, стеаринова, олеїнова, арахідова, ейкозатрієнова, ди-гомо-альфа-ліноленова, хенейкозанова, бегенова, ейкозадієнова і докозагексадієнова кислоти. Поліненасичені жирні кислоти на додаток до їхньої протизапальної, судинорозширювальної, антигіпертензивної та імуносупресивної дії можуть викликати зменшення

кількості ліпідів у плазмі крові та нормалізувати гіперглікемію (Cruz et al., 2019; Guermouche et al., 2014).

Отже, наявність значної кількості різноманітних біологічно активних речовин з різними властивостями, які входять до складу надземної та кореневої частин якона визначає важливе значення цієї рослини як перспективного джерела лікарської сировини для створення нових природних препаратів з гіпоглікемічною дією. Найцінніші властивості якона – гіпоглікемічну та антиоксидантну дію якона пов'язують з наявністю у його складі фруктозанів (інулін) та поліфенольних сполук.

Підсумок до огляду літератури

Аналіз літературних даних дає змогу зробити висновок про те, що оксидативний стрес зумовлений хронічною гіперглікемією відіграє вирішальну роль у розвитку дисфункції β -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози та їхньої загибелі за умов цукрового діабету. Використання антиоксидантів та інгібіторів стрес-залежних сигнальних каскадів є одним з підходів у розробці нових препаратів антидіабетичної дії.

Відомо, що нейтрофіли відіграють важливу роль у виникненні та прогресуванні цукрового діабету 1 типу. Детальніші дослідження ролі цих клітин у патогенезі ЦД та розвитку його ускладнень сприятимуть з'ясуванню, яким чином токсичні речовини, які секретують нейтрофіли, а також взаємодія з іншими імунними клітинами сприяє активації і рекрутуванню нейтрофілів, що зумовлює пошкодження острівців підшлункової залози. Краще розуміння ролі нейтрофілів в патогенезі ЦД 1 типу визначатиме їхню роль як мішені для терапевтичних втручань при цій патології. Власне, процеси активації нейтрофілів, зв'язування з ендотелієм, трансендотеліальна міграція, проникнення в острівцеві клітини підшлункової залози і вивільнення цитостатичних продуктів є потенційними мішенями, на які може бути спрямована антидіабетична терапія.

Традиційно, біологічно активні речовини лікарських рослин розглядалися як цінні джерела природних засобів для лікування багатьох захворювань людини, і зокрема, ЦД. Фармацевтичний ринок лікарських засобів природного походження бурхливо розвивається, а докази їхньої ефективності зростають. Нині майже 25 % фармацевтичних препаратів у світі отримують з рослин. Експериментального підтверджено антидіабетичний ефект значної кількості лікарських рослин, проте, лише для деяких з них з'ясовано механізм дії. Тому з'ясування механізмів антидіабетичної дії комплексу біологічно активних фітокомпонентів, є актуальною проблемою, що потребує вирішення з метою створення на їхній основі антидіабетичних препаратів природного походження.

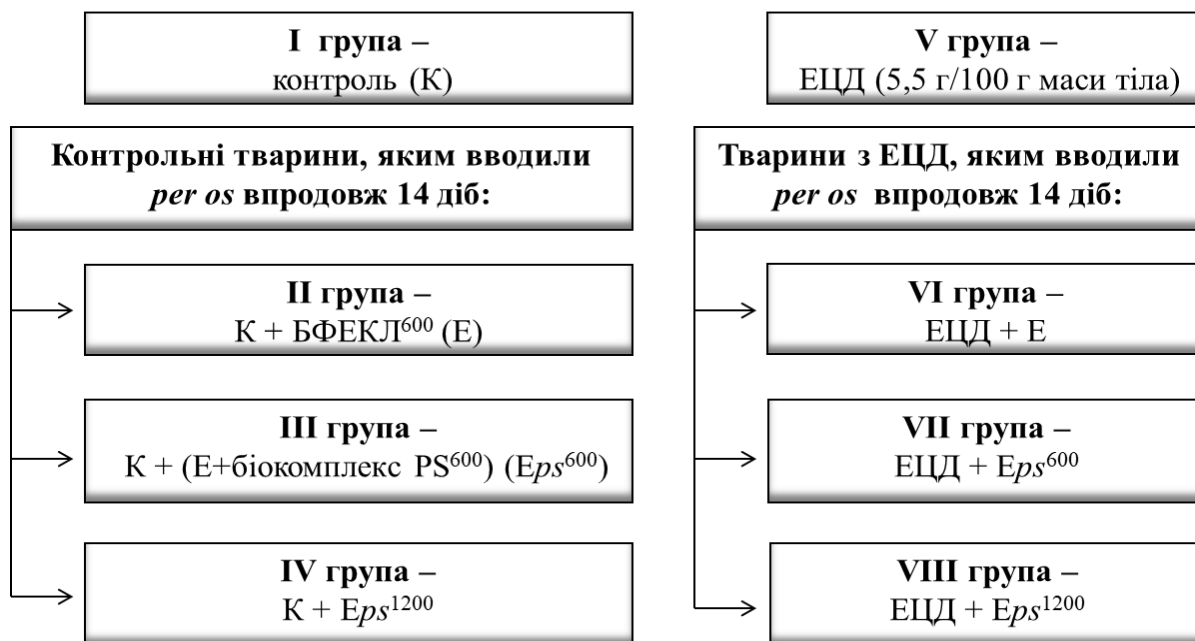
Однак, є проблеми, які перешкоджають ефективному впровадженню препаратів природного походження у клінічну практику. Низька розчинність у воді низки БАР, зокрема, флавоноїдів та терпеноїдів, створює труднощі у застосуванні антидіабетичних препаратів на їхній основі. Перспективними напрямками покращення біодоступності фітокомпонентів є їхня хімічна модифікація (Das et al., 2022) та використання систем нанодоставки (Al-Kassas et al., 2017). До того ж, з огляду на широкий спектр БАР у складі фітопрепаратів важко повністю з'ясувати їхні численні механізми антидіабетичної дії. Подальший активний скринінг біологічно активних метаболітів дасть змогу підтвердити їхній потенціал у лікуванні ЦД та профілактиці його ускладнень.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Дизайн експерименту

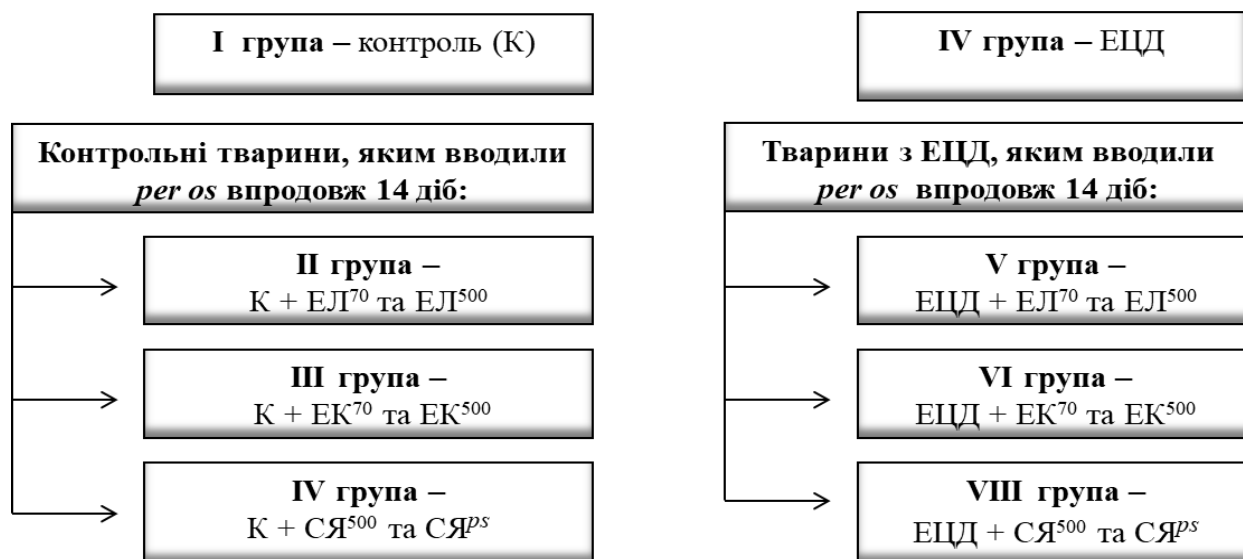
ЕЦД індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину у дозі 5,5 мг на 100 г маси тіла тварини. Стрептозотоксин розводили у 10 мМ цитратному буфері (рН 5,5). Через два тижні після індукції ЦД тваринам *per os* вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* та водні екстракти листя, кореневих бульб та суспензію порошка кореневих бульб *S. sonchifollius*. Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* та суспензію кореневих бульб *S. sonchifollius* стабілізували застосовуючи біокомплекс поверхнево-активних речовин на основі рамноліпідів, що є продуктом біосинтезу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 (біосурфактант PS-17).

Для оцінки біологічної дії позбавленого від алкалоїдів екстракту *G. officinalis* тварин було поділено на 8 груп:



Примітки: БФЕКЛ – безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського;
E_{PS}⁶⁰⁰ – стабілізована за допомогою біосурфактанту PS-17 (PS) безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського у дозі 600 мг/кг;
E_{PS}¹²⁰⁰ – стабілізована за допомогою біосурфактанту PS-17 (PS) безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського у дозі 1200 мг/кг;

Для оцінки біологічної дії екстрактів і суспензій *S. sonchifollius* тварин було поділено на 8 груп:



Примітки: ЕК⁷⁰ і ЕК⁵⁰⁰ – екстракт кореневих бульб у дозах 70 та 500 мг/кг, відповідно; ЕЛ⁷⁰ і ЕЛ⁵⁰⁰ – екстракт листя у дозах 70 та 500 мг/кг, відповідно; СЯ⁵⁰⁰ – суспензія якона у дозі 500 мг/кг (нестабілізована форма); СЯ^{PS} – суспензія якона у дозі 500 мг/кг (стабілізована форма за допомогою біосурфактанту PS-17 (PS))

У роботі використовували білих безпородних щурів (вік 4–5 місяців, маса 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, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1985).

2.2. Характеристика об’єкту досліджень

У роботі було використано *G. officinalis*, інтродуковану у Ботанічному саду Львівського національного університету імені Івана Франка та Дослідній станції лікарських рослин Інституту агроєкології Української академії аграрних наук УААН (с. Березоточча, Полтавська обл). Лікарську сировину збирали в період цвітіння, висушували в темряві при кімнатній температурі. Для

експериментів використовували надземну частину *G. officinalis* (з 1 кг сирої трави отримували 250 ± 40 г повітряно-сухої маси).

Рослинна сировина *S. sonhifolius* була вирощена в Київській області на сірому лісовому грубопилювато-легкосуглинковому ґрунті. Листя та кореневі бульби збирали восени. Для досліджень використовували надземну (листя, стебла, черешки) та кореневу (шкірки корневих бульби та кореневі бульби) частини *S. sonhifolius*. З 1 кг сирого листя вихід повітряно-сухої маси становив 220 ± 30 г, з 1 кг свіжих корневих бульб *S. sonhifolius* вихід повітряно-сухої маси корневих бульб становив 300 г.

Для експериментальних досліджень використовували клітини периферичної крові (еритроцити, лейкоцити), білого ростка кісткового мозку, підшлункової залози і плазму крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та водних екстрактів (листя, корневих бульб) і суспензій на основі порошку корневих бульб *S. sonhifolius*.

2.3. Отримання безалкалоїдної фракції екстракту *G. officinalis* та стабілізація за допомогою біокомплексу PS

Етанольний екстракт отримували настоюванням подрібненої надземної частини *G. officinalis* (30 г) у 96 % C_2H_5OH (підкисленому 0,1 н HCl до pH 2) у співвідношенні 1: 5, впродовж 12 год при кімнатній температурі. Отриманий етанольний екстракт упарювали у вакуумі за допомогою роторного випарювача (LABOROTA 400) при температурі $+50...+55^{\circ}C$ до одержання густого залишку екстракту. До максимально упареного етанольного екстракту додавали 9 мл води (до отримання однорідної маси) та 9 мл хлороформу. Зразки ретельно перемішували та центрифугували 10 хв при 1500 об/хв. Отримували дві фракції: водну – темно-коричневого забарвлення та хлороформну – темно-зеленого забарвлення. Обидві фракції упарювали у вакуумі при температурі $+40...+50^{\circ}C$ до одержання сухого залишку масою 3–3,5 г та 1–1,5 г, відповідно.

Для експериментів використовували хлороформну (безалкалоїдну) фракцію, яка є нетоксичною.

Органолептичні і фізико-хімічні властивості позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*, а саме, розчинність, сухий залишок, втрата в масі при висушуванні було визначено за допомогою загальноприйнятих методик, які наведено у Державній Фармакопеї України (ДФУ, друге видання, 2018).

У роботі використовували біосурфактант PS-17 – продукт біосинтезу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення ФКГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України (реєстраційний номер у Депозитарії ІМВ ім. Д. К. Заболотного *Pseudomonas sp.* ІМВ В-7434).

При розчиненні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у воді утворюється нестійка суспензія. Стабілізацію цього екстракту здійснювали додаванням рамноліпідного біокомплексу PS-17 у концентраціях 0,6, 2,0 і 3,3 г/л з подальшим струшуванням на вортексі. Структуру емульсій вивчали за допомогою мікроскопа “Kruess” (Німеччина).

Згідно з токсикологічним паспортом, середньосмертельна доза (ЛД₅₀) біосурфактанту PS-17 для білих щурів і мишей, за умови внутрішньошлункового введення культуральної рідини, становить більше 10 г/кг, отже, цей біокомплекс належить до речовин 4 класу небезпеки (Токсиколого-гігієнічний паспорт біопрепарату PS (біоПАР PS), 2004). З огляду на це, біосурфактант PS-17 у концентрації (0,6–3,3 г/л) є нетоксичним для людини і тварин.

Стабілізований фітопрепарат на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозах 600 та 1200 мг на 1 кг маси тіла вводили тваринам в об’ємі 1 мл води за вищенаведеною схемою (див. 2.1). Оптимальну дозу досліджуваного екстракту визначали виходячи з літературних даних (Ковальов В.М. et al., 1985; Липиніна Л. А., 1965; Seyd-Hosein Abtahi-Evari, 2017).

2.4. Аналіз компонентного складу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Загальноосадові реакції виявлення алкалоїдів (Шелудько & Колесниченко, 1965)

Загальноосадові реакції на алкалоїди ґрунтуються на здатності алкалоїдів утворювати нерозчинні прості або комплексні солі з кислотами, солями важких металів, гетерополікислотами.

Кілька крапель хлороформної та водної фракцій екстракту *G. officinalis* наносили на окремі предметні скельця і висушували на повітрі. Залишок розчиняли в 1-2 краплях 0,1 н НСl. Поруч наносили 1-2 краплі відповідного реактиву і зєднували краплі скляною паличкою. При наявності алкалоїдів у зоні зіткнення крапель утворюється осад або каламуть.

Для осадження алкалоїдів використовували такі реактиви:

- реактив Бушарда (1 г I_2 та 2 г KI на 50 мл H_2O) з підкисленим водним розчином солей алкалоїдів утворює бурий осад (гідройодиди алкалоїдів);
- реактив Майєра (1,35 г $HgCl_2$ та 5 г KI на 100 мл H_2O) – утворює білі або жовтуваті осад з більшістю алкалоїдів у слабопідкислених або нейтральних розчинах;
- реактив Драгендорфа ($BiI_3 + KI$ ($KBiI_4$)) – розчиняли 8 г основного нітрату вісмуту в 20 мл 30 % HNO_3 , у розчин розмішуючи повільно вливали KI (27,2 г на 30 мл води) та залишали на деякий час. Після того, як KNO_3 викристалізувався, розчин зливали з кристалів і доводили до 100 мл). Реактив Драгендорфа з сульфатнокислими розчинами алкалоїдів утворює оранжево-червоні або цегляно-червоні осад;
- реактив Зонненштейна (1% розчин $H_3PO_4 \times 12MoO_3 \times 2H_2O$) – один з найчутливіших реактивів на алкалоїди, утворює жовтуватий осад, який внаслідок відновлення молібденової кислоти набуває синього або зеленого забарвлення.

Кількісне визначення вмісту поліфенолів

Загальний вміст поліфенолів визначали методом Фоліна–Чокальтеу (Singleton et al., 1999). При взаємодії з поліфенолами реактив Фоліна–Чокальтеу, який складається із суміші фосфорно-вольфрамової й фосфорно-молібденової кислот, відновлюється з утворенням суміші оксидів блакитного забарвлення з максимумом поглинання при довжині хвилі 765 нм. Як стандарт використовували галову кислоту. Результат виражали як еквівалент галової кислоти на 1 г екстракту (мг ЕГК/г).

Хромато-мас-спектрометричне визначення компонентного складу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Компонентний склад безалкалоїдного екстракту визначали за допомогою хроматографа Agilent Technology 6890N з мас-спектрометричним детектором 5979B. При проведенні аналізу використовували хроматографічну колонку капілярну – HP-5MS (30 м), внутрішній діаметр 250 мкм, фаза 0,25 мкм. Газоносій – гелій за постійної швидкості потоку 1,5 мл/хв і об’ємі проби 1 мкл. Автоінжектор 7683B, Split 20:1, температура випарювача 250 °C. Температура термостата становила від 75 °C (2 хв) з нагріванням 15 °C/хв до 300 °C (9 хв). Детектор мас-селективний, температура інтерфейса 280 °C, іонізація – електронним ударом, енергія іонізації 70 еВ, температура іонного джерела 230 °C, температура квадруполя 150 °C.

Загальна тривалість газової хроматографії становила 24 хв. Вміст (%) кожного компонента розраховували методом порівняння його середньої площі піку до загальної площі. Ідентифікацію здійснювали на основі порівняння мас-спектрів з даними мас-спектральних бібліотек NIST05a та WILEY із загальною кількістю спектрів понад 470 000.

Ідентифікацію та кількісну оцінку сполук фенольної природи у складі *G. officinalis* проводили за допомогою системи ультраефективної рідинної хроматографії Acquity (UPLC) у поєднанні з мас-спектрометрією (MS) з

квадрупольним аналізатором (Q-TOF) (UPLC/Synapt Q-TOF MS, Waters Corp., Milford, MA, США) та джерелом іонізації електророзпиленням (ESI). Розподіл сполук було досягнуто на колонці Acquity BEH C18 (100 mm × 2.1 mm; 1.7 μm; Вода). Фенольні кислоти, флавоноїди та антоціани були ідентифіковані за допомогою негативної електроспрей-іонізації.

Кількісний аналіз проводили за допомогою системи Dionex (Germering, Німеччина), оснащеної детектором на діодній матриці Ultimate 3000, четвертинним насосом LPG-3400A, автовідбірником EWPS-3000SI та термостатованим відділенням для колон TCC-3000SD, що контролюється програмним забезпеченням Chromeleon v.6.8. Використовували колонку Cadenza Imtakt C5-C18 (75 × 4,6 mm, 5 μm). Результати виражали у мкг на 50 г сухої маси.

2.5. Отримання водних екстрактів листя і кореневих бульб, а також отримання та стабілізація суспензії порошку кореневих бульб *S. sonhifolius* за допомогою біосурфактанту PS-17

З надземної (листя, стебла, черешки) та кореневої (шкірки корневих бульби та кореневі бульби) частин *S. sonhifolius* виготовляли водні екстракти настоюванням окремих частин рослини у воді (1:10) у два послідовні етапи: перший – 15 хв при температурі 100°C, другий – 45 хв при 20°C. Отримані екстракти фільтрували і упарювали у вакуумі за допомогою роторного випарювача LABOROTA 4001 (Heidolph, Німеччина) при температурі 60–65 °C. Для досліджень використовували водні розчини упарених екстрактів *S. sonhifolius*. Ці екстракти вводили тваринам *per os* у дозах 70 мг/кг та 500 мг/кг маси тіла тварини впродовж 14 днів (див. схему у розд. 2.1.).

Для отримання суспензії на основі порошку кореневих бульб *S. sonhifolius* спочатку сухі бульби подрібнювали за допомогою подрібнювача ріжучої та розпилючої дії до одержання однорідної порошкоподібної маси. Суспензію

кореневих бульб отримували змішуванням 0,075 г порошку кореневих бульб та 1 мл води.

Стабілізацію суспензії на основі порошку кореневих бульб *S. sonhifolius* за допомогою біосурфактанту PS-17 здійснювали двома способами. Перший спосіб отримання стабільної субстанції, полягав у додаванні до контрольної суспензії сурфактанту PS-17 у концентраціях 0,01 г/л, 0,02 г/л, 0,03 г/л. Для одержання стабільної субстанції другим способом, порошок кореневих бульб *S. sonhifolius*, попередньо змішували з біосурфактантом PS-17. Для цього однорідну порошкоподібну масу кореневих бульб поміщали рівномірним тонким шаром (товщиною не більше 2 мм) у ємність та по всій поверхні порошку розпилювали біосурфактант PS-17 з розрахунку 0,01 г/мл води на 0,075 г порошку *S. sonhifolius*. Після висихання порошок кореневих бульб змішували з 1 мл води.

У роботі використовували нестабілізовану суспензію кореневих бульб та стабілізовану форму цієї суспензії, яку отримували додаванням до контрольної суспензії сурфактанту PS-17 у концентрації 0,01 г/мл. Одержані суспензію кореневих бульб та її стабілізовану форму вводили тваринам *per os* у дозі 500 мг порошку кореневих бульб на 1 кг маси тіла, в об'ємі 1 мл води за схемою наведеною у розд. 2.1.

Підбір доз досліджуваних екстрактів та суспензій *S. sonhifolius* було здійснено відповідно до літературних даних, в яких описано гіпоглікемічну дію водно-етанольних та етанольних екстрактів якона у дозах 50 – 500 мг/кг (Baroni et al., 2008; Caetano et al., 2016; Choque Delgado et al., 2013; Honore & Genta, 2015; Susana B. Genta et al., 2005).

2.6. Визначення концентрації глюкози та толерантності клітин до глюкози

Глюкозотолерантний тест (ГТТ) проводили після 18-годинного голодування тварин. Навантаження глюкозою здійснювали введенням *per os*

розчину глюкози (1 г / кг маси тіла). До навантаження та кожні 10 хв після навантаження проводили забір крові з хвостової вени щурів. Концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом використовуючи аналітичний набір “Філісіт-Діагностика”. Будували глікемічну криву. За допомогою правила трапецій розраховували площу під глікемічними кривими – AUCglu (area under a curve), що відображає загальне підвищення концентрації глюкози (Yeh, 2002).

2.7. Визначення вмісту глікованого гемоглобіну (Сибірна et al., 2006)

Вміст глікованого гемоглобіну (HbA1c) в еритроцитах визначали колориметричним методом, який ґрунтується на кислотному гідролізі кетоамінного зв'язку за наявності оксалоацетату. У результаті реакції утворюється 5-оксиметилфурфурол, при взаємодії якого з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) утворюється забарвлений комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 443 нм.

До 2 мл гемолізату еритроцитів додавали 1 мл 0,3 М оксалоацетату та інкубували 1 год (при 95°C). Проби охолоджували та додавали 1 мл 40 % ТХО, струшували і центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 0,05 М ТБК та інкубували 40 хв при 40°C. Через 20 хв вимірювали екстинкцію при довжині хвилі 443 нм. Значення екстинкції 0,029 відповідає концентрації HbA1c, що становить 1 %.

2.8. Імуноензимний аналіз вмісту інсуліну, С-пептиду та фактора некрозу пухлин-альфа

Вміст інсуліну, С-пептиду та TNF-α у плазмі крові щурів визначали імуноензимним методом застосовуючи стандартні набори ELISA фірми згідно інструкцій фірм-виробників.

2.9. Світлова мікроскопія клітин підшлункової залози

Для гістологічного дослідження з допомогою світлової мікроскопії зразки підшлункової залози фіксували у рідині Буена 12 год (при температурі +4° C). Після фіксації матеріал зневоднювали за стандартною методикою в етанолі з висхідною концентрацією і заливали у гістомікс. Після цього гістологічні зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали гематоксиліном Майєра і еозином, для верифікації β-клітин зрізи зафарбовували хром-гематоксиліном за Гоморі та альдегід-фуксином за Gabe (Williams M., 1977). Дослідження мікропрепаратів, морфометрію та виготовлення мікрофотографій проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus CX-41, оснащеного цифровою фотокамерою Olympus (Японія).

Морфометричний аналіз острівцевого апарату підшлункової залози проводили на базі комп'ютерної програми ImageJ. Визначали показник щільності розташування острівців (кількість острівців Лангерганса на стандартній площі (N/10 мм²)), їхню індивідуальну площу (S, мкм²), діаметр (Di, мкм), об'єм (Vi, мкм³), кількість β-клітин на 1000 мкм². Калібровку проводили за допомогою об'єктмікрометра, при якому знайдено відповідність мікрометрів пікселям на екрані монітора.

Площу острівців визначали способом окреслення контурів. Для обчислення діаметру острівців вимірювали їх найбільшу (a) та найменшу (b) осі, використовуючи формулу. Беручи до уваги, що острівці підшлункової залози є сфероїдною структурою, для визначення середнього діаметру острівців використовувалася формула Fullman (Williams M., 1977):

$$D = \frac{\pi}{2} \times \frac{N}{\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} \dots \dots \frac{1}{d_N}},$$

де N - є загальною кількістю вимірів. Цей діаметр використовували для визначення середнього об'єму острівців підшлункової залози за формулою (Williams M., 1977):

$$V = \frac{4\pi}{3} \times \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

Кількість β -клітин визначали способом точкового рахунку після фарбування гістологічних зрізів хром-гематоксиліном за Гоморі.

2.10. Виділення та визначення кількості лейкоцитів периферичної крові щурів

Лейкоцити виділяли у градієнті густини фікол-тріомбраз (ρ = 1,076–1,078 г/см³) (Лаповець, 2004). У пластикову пробірку вносили 3 мл фікол-тріомбразу і зверху нашаровували 5–7 мл крові, попередньо розведеної забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), рН 7,4 у співвідношенні 1:1. Центрифугували при 1000 об/хв впродовж 25 хв. Відбирали кільце лейкоцитів, яке знаходиться на межі між еритроцитами та плазмою. Отриману суспензію лейкоцитів двічі промивали ЗФР при 1500 об/хв по 5 хв. Життєздатність клітин у тесті із трипановим синім становила не менше 98 %.

До 0,4 мл 3% CH₃COOH, підфарбованої метиленовим синім, додавали 0,02 мл капілярної крові з антикоагулянтном. Кількість лейкоцитів визначали методом підрахунку у камері Горяєва.

2.11. Флюоресцентний аналіз рівня активних форм Оксигену у лейкоцитах

Рівень АФО у лейкоцитах визначали за допомогою DCFH₂-DA (англ. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). DCFH₂-DA проникає у клітину та під дією неспецифічних естераз перетворюється на DCFH₂ (англ. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein). При окисненні внутрішньоклітинними АФО та АФН (HO·, ROO·, NO та ONOO·⁻) DCFH₂ перетворюється у флюоресціюючий DCF (англ. dichlorofluorescein) (довжина хвилі збудження – 515 нм, емісії – 535 нм) (Gomes et al., 2005).

Лейкоцити (2·10⁶ клітин) ресуспендували у буферному розчині (10 мМ

HEPES/NaOH (pH = 7,4), 140 mM NaCl і 2,5 mM CaCl₂) та інкубували з 2',7'-дихлородигідрофлюоресцеїн діацетатом у концентрації 3 мкМ 45 хв при температурі 37°C. Клітини промивали у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР). Зразки аналізували на флюоресцентному мікроскопі Nikon Optiphot ("Nikon", Японія). Для фіксації зображення використовували відеокамеру для мікроскопа (DCM310). Для аналізу та обробки зображень використовували програму Image J 1.47t. Інтенсивність флюоресценції DCF виражали в умовних одиницях (у.о.).

2.12. Лізис лейкоцитів

Лізис лейкоцитів здійснювали використовуючи буфер такого складу: 10 mM трис-HCl, 5 mM ЕДТА, 150 mM NaCl, 1% тритон X-100, 5 mM NaF, 1 mM фенілметилсульфонілфторид), 5 mM бензамідин, 10 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину), 2 мкг/мл пепстатину, 0,25 mM Na₃VO₄ 1:10 за об'ємом. На 10 млн лейкоцитів додавали 350 мкл буферу. Лізис проводили 60 хв на льодяній бані.

2.13. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів (Сибірна, Маєвська, et al., 2006)

Принцип методу ґрунтується на активації ПОЛ Fe²⁺ до рівня, який реєструють спектрофотометрично. При високій температурі, у кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм.

До 0,2 мл зразка додавали 3 мл 10 mM K,Na-фосфатного буферу, приготованого на 125 mM KCl (pH 7,4). Для індукції ПОЛ додавали 0,5 мл 1 mM KMnO₄, та двічі з інтервалом у 10 хвилин по 0,5 мл 10 mM FeSO₄. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 % ТХО. Осад відцентрифугувували при 3000 об/хв протягом 15 хв. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1н HCl і 1 мл 0,7 % ТБК та інкубували впродовж 20 хв на водяній бані при температурі 100°C.

Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, перемішували і центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв. Екстинкцію вимірювали у верхньому бутаноловому шарі при $\lambda=532$ нм. Для розрахунків використовували молярний коефіцієнт поглинання комплексу МДА з ТБК, що становить $156\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.14. Визначення вмісту карбонільних груп протеїнів (*Demkovych et al., 2017*)

Вміст карбонільних груп протеїнів визначали за кількістю динітрофенілгідразонів, які утворювались внаслідок взаємодії цих груп із 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ).

У центрифужні пробірки вносили 0,8 мл 0,85 % NaCl, 0,2 мл лізату лейкоцитів, 1 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2 н HCl і 1мл 10 % ТХО. У контрольну пробу замість 2,4-ДНФГ вносили 1 мл 2н HCl. Проби інкубували 1 год при 37°C, центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Осад промивали тричі 5 % ТХО, додавали 5 мл 8 М розчину сечовини. Інкубували 5 хв на киплячій водяній бані до повного розчинення. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру вимірювали при довжині хвилі 370 та 430 нм, відповідно. Для розрахунків використовували коефіцієнти молярного поглинання динітрофенілгідразонів нейтрального ($22\,000\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) та основного ($16\,800\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) характеру.

2.15. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікації протеїнів у плазмі крові (*Putta & Eswar, 2015*)

Метод ґрунтується на здатності AGEs до флюоресценції при довжині хвилі збудження 370 нм та довжині хвилі емісії 440 нм. Для проведення вимірювань плазму розводили у 50 разів ЗФБ (рН 7,4). Як стандарт використовували розчин бичачого сироваткового альбуміну (1 мг/мл) розведеного в 0,1 н NaOH, значення якого приймали одну одиницю флюоресценції (AU). Флюоресценцію AGEs вимірювали на спектрофлюориметрі Shimadzu RF-6000 при довжині

хвилі збудження 370 нм та емісії – 440 нм, використовуючи програмне забезпечення LabSolutions RF. Вміст AGEs виражали в AU/мг білка.

2.16. Імуноцитохімічна детекція вмісту AGEs та RAGE у лейкоцитах (Беркало *et al.*, 2003; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2007; Kalousova *et al.*, 2002)

Для візуалізації AGEs та мембранозв'язаних рецепторів RAGE використовували непрямий імуноцитохімічний метод.

Лейкоцити (100 тис. клітин в 1 мл ЗФР), наносили на предметне скло, фіксували метанолом при температурі -4°C впродовж 10 хв та занурювали в охолоджений ацетон на 2–3 хв. Фіксовані клітини інкубували з 0,3 % H_2O_2 впродовж 5 хв для блокування ендогенної пероксидази. Для блокування вільних центрів зв'язування фіксовані клітини інкубували з 1 % БСА (Sigma-Aldrich, США) та пермеабілізували 0,1 % розчином тритону X-100 в ЗФР. Для детекції AGEs / RAGE клітини інкубували з моноклональними антитілами до AGEs (1:300) / RAGE (1:200) у ЗФР, що містив 1% БСА впродовж 2 годин за кімнатної температури у вологій камері. На наступному етапі проводили інкубацію з другими біотинільваними антитілами (1:200) у ЗФР, що містив 1% БСА впродовж 1 години при кімнатній температурі у вологій камері. Після відмивання зразків, проводили візуалізацію місць зв'язування антитіл зі специфічними білками. Препарати обробляли 0,05 % 3,3'-діамінобензидину в об'ємі 70 мкл та інкубували 5–8 хв. Місця зв'язування антитіл оцінювали за інтенсивністю пероксидазної реакції, яку виявляли за інтенсивністю утворення коричневого забарвлення. Аналіз вмісту досліджуваних протеїнів здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням інвертованого мікроскопа (Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74). Інтенсивність зв'язування антитіл оцінювали у щонайменше 500 клітинах за шкалою: AGEs⁻ / RAGE⁻ – негативна реакція; AGEs⁺ / RAGE⁺ – позитивна реакція.

2.17. Визначення активності ензимів антиоксидантного захисту (Сибірна, Масєвська, та ін., 2006)

Супероксиддисмутаза, СОД (КФ 1.15.1.1). Принцип методу ґрунтується на здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, які утворюються при взаємодії НАДН і феназинметасульфату. В результаті цієї реакції нітросиній тетразолій відновлюється до гідразинтетразолію (нітроформазан). За наявності СОД відсоток відновлення нітросинього тетразолію знижується. До 2 мл інкубаційної суміші (39 мМ ЕДТА-Na, 114 мМ нітротетразолій синій, 54 мМ феназинметасульфат, розчинені у 0,15 М фосфатному буфері, рН 7,8) додавали 0,1 мл НАДН (152 мг НАДН розчинений у 100 мл трис-ЕДТА буферу, рН 8,0). Через 10 хв вимірювали екстинкцію при довжині хвилі 540 нм. Активність СОД визначали за відсотком блокування утворення нітроформазану та виражали в умовних одиницях (1 ум. од. = 50 % блокування реакції утворення нітроформазану) на 1 мг протеїну. Отримані значення переводили у Міжнародні одиниці (U), відповідно до значень калібрувальної кривої.

Каталаза (КФ 1.11.1.6). Активність каталази визначали за здатністю цього ензиму розщеплювати пероксид гідрогену. При взаємодії гідроген пероксиду зі солями молібдену утворюється стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 410 нм. Інтенсивність забарвлення цього комплексу залежить від кількості H_2O_2 у досліджуваному зразку. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл лізату лейкоцитів до 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 . Холоста проба містила 1 мл розчину молібдату амонію та 2 мл H_2O_2 . Реакцію у дослідній пробі зупиняли через 10 хв додаванням 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 1 мл розчину молібдату амонію. У холосту пробу вносили 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 0,1 мл лізату. Проби центрифугували 10 хв при 10 000 g. Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично при $\lambda=410$ нм. Для розрахунків використовували молярний коефіцієнт поглинання комплексу H_2O_2 з молібдатом амонію, що становить $22\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Глутатіонпероксидаза, ГПО (КФ 1.11.1.9). Активність ГПО вимірюють за швидкістю окиснення відновленого глутатіону за наявності гідропероксиду третинного бутилу. В основі розвитку кольорової реакції – взаємодія SH-груп глутатіону з реактивом Еллмана (0,01 М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі) з утворенням кольорового продукту – тіонітрофенільного аніону. До 0,1 мл лізату лейкоцитів додавали 0,83 мл 0,1 М трис-НСІ буфером, що містив 6 мМ ЕДТА, 12 мМ NaN_3 і 4,8 мМ GSH (рН 8,5) та інкубували при 37°C впродовж 10 хв. До реакційної суміші додавали 0,07 мл 20 мМ гідропероксиду трет-бутилу та інкубували 5 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл ТХО 20 % (охолоджена). Пробу з ТХО центрифугували при 10 000 g 10 хв. До 2 мл 0,1 М трис-НСІ буферу (рН 8,5) додавали 0,02 мл супернатанту і 0,02 мл реактиву Еллмана. Через 5 хв проби фотометрували при довжині хвилі 412. Для розрахунків використовували молярний коефіцієнт поглинання тіонітрофенільного аніона, що становить $11\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.18. Визначення вмісту відновленого глутатіону (Rizvi & Zaid, 2001)

Визначення вмісту відновленого глутатіону ґрунтується на реакції сульфгідрильних груп з реактивом Еллмана (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота). До 0,5 мл лізату лейкоцитів додавали 3,5 мл розчину H_2SO_4 (0,36 н), інкубували впродовж 10 хв для осадження білків. Після цього додавали 1 мл розчину NaWO_4 (10 %). Проби центрифугували при 10 000 g впродовж 10 хв. Супернатант (1 мл) переносили в пробірки, додавали 0,75 мл 2 М трис-НСІ буферу (рН 8,4), 0,5 мл ацетону і 0,25 мл реактиву Еллмана. Вимірювали екстринкцію при довжині хвилі 412 нм.

Вміст відновленого глутатіону розраховували використовуючи молярний коефіцієнт поглинання, який становить $13\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ та виражали в нмоль·мг⁻¹ протеїну.

2.19. Визначення антиоксидантної активності *in vitro*

Метод DPPH базується на здатності стабільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу взаємодіяти з донорами протонів, включно з фенолами. DPPH• не реагує з флавоноїдами, які не містять гідроксильних груп у В-кільці, а також з ароматичними кислотами, що містять тільки одну гідроксильну групу. У пробірки вносили 50 мкл досліджуваного екстракту та додавали 1400 мкл свіжоприготовленого розчину $6 \cdot 10^{-5}$ моль/л DPPH-радикалу. Реакційну суміш інкубували у темряві 30 хв. Знебарвлення розчину DPPH свідчить про його відновлення, і супроджується зниження екстинкції при довжині хвилі 570 нм. (Shahidi & Zhong, 2015; Yen & Chen, 1995). Розчин тролоксу (0,02–0,2 (мМ)) використовували як еталонний стандарт для побудови стандартної кривої. Активність поглинання радикалів DPPH виражали в мкмоль еквіваленту тролоксу на 1 г зразка (мкмоль ТЕ/ г зразка).

Метод ABTS базується на здатності досліджуваних сполук з потенційною антиоксидантною активністю нейтралізувати стабільні АБТС⁺ радикали. (Pellegrini *et al.*, 1999; Shahidi & Zhong, 2015). Для отримання катіонів ABTS радикалів (ABTS⁺) змішували персульфат калію (2,45 мМ) і розчин АБТС (7 мм) та інкубували у темряві при кімнатній температурі впродовж 12-16 год, перед застосуванням. Перед використанням розчин розводили до досягнення екстинкції $0,700 \pm 0,02$ при 734 нм. До 0,1 мл екстракту додавали 3,0 мл розведеного АБТС⁺. Реакційну суміш інкубували при температурі 30 °С впродовж 10 хв. Вимірювали екстинкцію при довжині хвилі 734 нм. Обрахунок результатів здійснювали, як описано в методі DPPH (ст. 85).

FRAP аналіз – метод дослідження залізовідновлювальної здатності сполук з потенційною антиоксидантною дією. Метод базується на відновленні 2,4,6-трис(2-піридил)-1,3,5-триазину заліза [Fe(III)-TPTZ] при низьких значеннях рН (Benzie & Strain, 1996; Khajehei & Merkt, 2018). Свіжий робочий розчин FRAP готували змішуючи 300 мМ ацетатного буфера (рН 3,6), 10 мМ 2,4,6-трис(2-піридил)-1,3,5-триазину заліза [Fe(III)-TPTZ] в HCl (10 мМ) і 20 мМ FeCl₃. у

співвідношенні 10:1:1. Змішували 0,15 мл екстракту та 2,85 мл розчину FRAP та інкубували при 37 °C впродовж 30 хв. FRAP зразків оцінювали шляхом вимірювання поглинаючої здатності Fe^{2+} -TPTZ на 593 нм і виражали в мкмоль TE/ г зразка.

2.20. Визначення вмісту нітрит- і нітрат-аніонів, сумарної активності NO-синтази та індукцйбельної ізоформи NO-синтази

Метод базується на реєстрації утворення забарвленого комплексу солі діазонію в результаті реакції нітрит-аніонів (NO_2^-) з сульфаніламідом та N(1-нафтил)-етилендіаміном у кислому середовищі. Для депротейнізації лізатів використовували 96% етиловий спирт (1:2), після чого зразки центрифугували при 3000 об/хв впродовж 20 хв. До 100 мкл супернатанту додавали 100 мкл реактиву Гріса (складається з рівних частин 0,05 % N-нафтилетилендіамін і 1% сульфаніламід у 5 % HCl) та інкубували 30 хв при температурі 37° C. Екстинкцію вимірювали при $\lambda=540$ нм. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували використовуючи стандартні розчини нітриту натрію.

Вміст нітрат-аніонів (NO_3^-) розраховували за різницею між сумарним вмістом метаболітів оксиду нітрогену та вмістом NO_2^- . Для визначення сумарного вмісту метаболітів NO проводили попереднє відновлення нітрат- до нітрит-аніонів використовуючи ванадій (III) хлорид. До 100 мкл супернатанту додавали 100 мкл реактиву Гріса та інкубували 30 хв при 37°C. Вимірювали екстинкцію при довжині хвилі 540 нм. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували із використанням стандартних розчинів нітрату натрію.

Для визначення сумарної активності NO-синтази (NOS), КФ 1.14.13.39 20 мкл лізату клітин інкубували зі субстратною сумішшю такого складу: 10 mM HEPES буфер, що містив 1 M MgCl_2 , 1 M CaCl_2 , 3 mM L-аргінін та 250 mM НАДФН впродовж 30 хв при 37 °C. Реакцію зупиняли додаванням 96%

етилового спирту. Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо депротейнізований лізат. Реакційну суміш центрифугували 20 хв при 3000 об/хв, в надосадовій рідині визначали вміст NO_2^- . Активність NOS у пробі виражали в нмолях $\text{NO}_2^-/\text{хв}$ на 1 мг протеїну. Для визначення активності індукцйбельної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 додавали ЕДТА. (Сибірна, Маєвська, *et al.*, 2006; Dawson & Knowles, 1999).

2.21. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі (Lowry, 1951).

2.22. Дослідження актинового цитоскелету

2.22.1. Кількісна оцінка вмісту полімеризованого актину методом протокової цитометрії (Torres & Coates, 1999)

Кількісну оцінку вмісту полімеризованого актину в лейкоцитах здійснювали за інтенсивністю флюоресценції фалоїдину міченого TRITC (тетраметил родамін-5-ізотіоціонат). Відмиті лейкоцити (1×10^5) пермеабілізували 0,03 % розчином Тритону X-100/ФСБ (5 хв, 0 °C), тричі промивали у ЗФР та інкубували з додаванням фалоїдину-TRITC (50 мкг/мл у розчині 0,02 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА)) упродовж 30 хв у темряві. Детекцію здійснювали за допомогою лазерного проточного цитометра (FACS Calibur, Becton Dickinson, США). Інтенсивність випромінювання зразків реєстрували за каналом FL2 (540–570 нм). Середню інтенсивність флюоресценції (середнє арифметичне значення сили свічення суспензії клітин ($2 \cdot 10^4$)), визначали за допомогою програмного забезпечення Cytomation Summit v3.1. (Cytomation, Inc., США) і виражали в у.о.

2.22.2. Фракціонування актину у лізатах лейкоцитів (Kleveta *et al.*, 2012; Kwiatkowska *et al.*, 2003)

Лейкоцити ($1,5 \cdot 10^6$) лізувати у 250 мкл буферу, що містив 0,5 % Тритон X-

100, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 2мМ EGTA, 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5) та коктейль інгібіторів протеаз протягом 10 хв (4°C).

Лізат лейкоцитів центрифугували 10 хв при 10 000 g. У результаті отримували супернатант (C₁), який містив короткі філаменти та мономери актину та осад (O₁), який містив довгі філаменти актину. 10 мкл супернатанту відбирали для SDS-ПААГ електрофорезу, решту піддавали високошвидкісному центрифугуванню (1 год, 100,000 g) для розділення мономерів актину, які містилися у супернатанті (C₂) та коротких філаментів актину, які містилися в осаді (O₂).

Розділення фракцій, що містять довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі філаменти та мономери актину здійснювали за схемою:

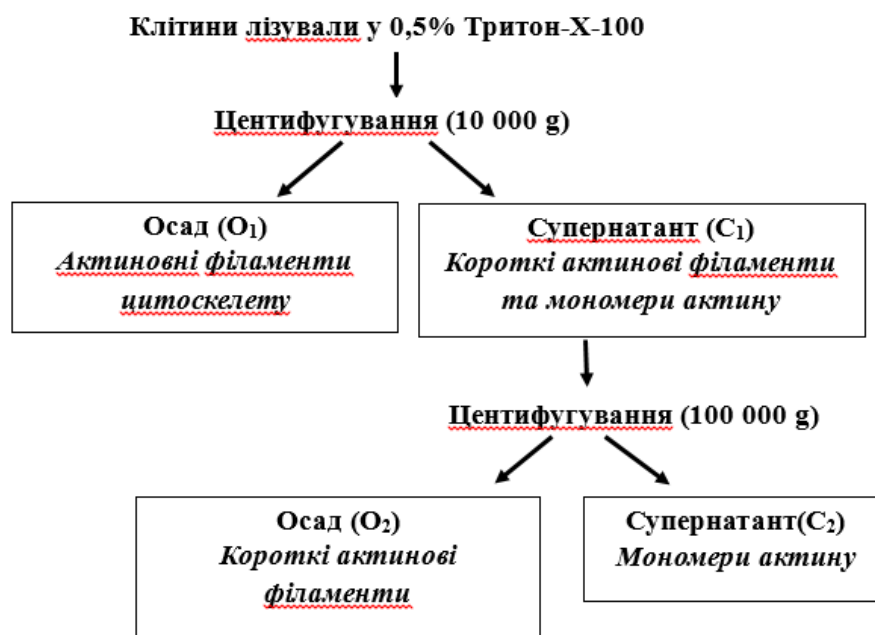


Рис. 2.1. Схема фракціонування лізатів лейкоцитів

2.22.3. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі

Мікрофіламенти мономери актину, які містилися в осадах (O₁ та O₂) та супернатантах (C₁ та C₂) розділяли методом SDS-ПААГ електрофорезу. Протеїни розділяли у блоках 15 %-го поліакриламідного гелю за наявності додецилсульфату натрію у буферній системі Лемлі. Електрофорез проводили

при силі струму 15 мА, напрузі 200 В і потужності 50 Вт на пластинку. Після електрофоретичного розділення досліджуваних лізатів здійснювали перенесення протеїнів з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану, як описано у роботах (*Kleveta et al., 2012; Kwiatkowska et al., 2003*).

2.22.4. Імоноблотинг протеїнів

Після електрофоретичного розділення досліджуваних протеїнів здійснювали трансфер протеїнів під дією електричного поля з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану, як описано у роботах (*Kleveta et al., 2012; Kwiatkowska et al., 2003*). Згідно до поставленої мети мембрану інкубували з першими антитілами (Monoclonal Anti-Actin antibody produced in mouse, Sigma, США), розведеними у 10 000 разів у блокуючому буфері. Як другі антитіла використовували анти-мишачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Anti-Mouse Ig G (whole molecule) – peroxidase, Sigma, США), розведені у 1000 разів. Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору реактивів для посиленої хемілюмінесценції (Millipore, США). Денситометричний аналіз результатів вестерн-блотингу здійснювали з використанням програми GelPro 3.1.

2.23. Методи дослідження апоптозу

2.23.1. Імуноцитохімічна детекція вмісту протеїнів p53 і Bcl-2 (*Беркало et al., 2003*)

Лейкоцити, наносили на предметне скло, фіксували метанолом впродовж 20 хв при температурі -4°C та впродовж 3–4 с в охолоджену ацетоні. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,1 % тритоном X-100. Для детекції протеїнів p53 та Bcl-2 клітини інкубували з моноклональними антитілами до p53 (клон DO-7, ізотип IgG2b) та моноклональними антитілами до Bcl-2 (ДАКО, США; клон 124, ізотип IgG1) у розведенні 1:25 разів. Як другі використовували біотинільовані антитіла LSAB®2 Biotinylated Link for

Streptavidin HRP/AP (DAKO, США) у розведенні 1:10 разів. Після цього препарати інкубували з авідин-біотин-пероксидазним комплексом ExtrAvidin Peroxidase у розведенні 1:125. Кольорову реакцію для детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3-амінобензидину Liquid DABSubstrateChromogen system (DAKO, США).

Підрахунок кількості лейкоцитів залежно від вмісту протеїнів p53 та Bcl-2 здійснювали за допомогою світлового мікроскопу MICROmed XS-5520, використовуючи $\times 40$ акроплановий об'єктив та відеокамеру DCM310 з програмним забезпеченням ScopePhoto. За інтенсивністю забарвлення лейкоцити було поділено на 3 групи: з негативною (p53⁻ та Bcl-2⁻), позитивною (p53⁺ та Bcl-2⁺) та різко позитивною (p53⁺⁺ та Bcl-2⁺⁺) реакцією на вміст протеїнів p53 та Bcl-2. Негативними контролями специфічності зв'язування слугували клітини без використання як перших так і других антитіл. На препараті диференціювали 500 досліджуваних клітин за вищезазначеною схемою.

2.22.2. Флюоресцентний метод аналізу апоптозу за зв'язуванням анексину V (Vermes et al., 1995)

Метод подвійного флюоресцентного фарбування клітин Анексин V-FITC (довжина хвилі збудження FITC – 494 нм та емісії 518 нм) та ПІІ (довжина хвилі збудження 536 нм та емісії 617 нм) дає змогу оцінити кількість живих клітин, а також клітин на ранніх та пізніх стадіях апоптозу.

Лейкоцити ($2 \cdot 10^5$) інкубували з додаванням Annexin V-FITC (2,5 мкг/мл) та 5 мкл PI (0,5 мкг/мл). Зразки аналізували на проточному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson, США), використовуючи детектор FL1(для FITC) та FL2 (для PI). На кожний варіант досліджу підраховували не менше 10 000 клітин. Результати виражали у відсотках від загальної кількості клітини, застосовуючи наступну схему: Анексин V⁻/PI⁻ – живі клітини, Анексин V⁺/PI⁻ – клітини з ранніми ознаками апоптозу; Анексин V⁺/PI⁺ – клітини з пізніми ознаками

апоптозу.

2.22.3. Біохімічна детекція апоптозу за визначенням вмісту фрагментованої ДНК (*Gercel-Taylor, 2005*)

Принцип методу полягає в утворенні забарвленого продукту при взаємодії дезоксирибози ДНК та дифеніламіновим реактивом. Лізис лейкоцитів прооводили з розрахунку 5 млн клітин на 0,05 мл буферу лізису (5 мМ трис-НСІ, 20 мМ EDTA (рН 8,0), 0,5 % тритон Х-100). Аліквоту кожної проби центрифугували 15 хв при 12000 об/хв, відділяючи інтактний хроматин (в осаді) від фрагментованої ДНК (у супернатанті). Далі кожную фракцію ресуспендували в 0,5 мл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ EDTA, рН 8,0) і додавали по 0,6 мл 1н НСІО₄, зразки охолоджували при температурі –4°С (20 хв). Одержані суспензії центрифугували 10 хв при 6700 об/хв, супернатант відбирали. Гідроліз проводили за допомогою 1н НСІО₄ (0,6 мл) при температурі 70°С (20 хв). В аліквотах супернатанту і осаду проводили кольорову реакцію з дифеніламіновим реагентом (1:2). Проби фотометрували при довжині хвилі 570 нм. Ступінь пошкодження ДНК обчислювали у відсотках як відношення її кількості в супернатанті до сумарного вмісту в осаді та супернатанті.

2.24. Виділення клітин кісткового мозку та оцінка проліферативної активності попередників лейкоцитів

Проліферативну активність кісткомозкових клітин-попередників лейкоцитів досліджували за допомогою методу імуноензимного аналізу згідно протоколу фірми-виробника набору “Brdu Cell Proliferation Assay”. Цей метод дає змогу кількісно оцінити рівень включення у проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину (BrdU). Тваринам вводили BrdU (“Millipore”, США) у дозі 50 мкг/г маси тіла внутрішньоочеревно. Через 12 год після введення BrdU тварин декапітували. Кістковий мозок виділяли зі стегнових кісток шляхом аспірації. Суспензію клітин кісткового мозку

фракціонували центрифугуванням у тришаровому градієнті густини фікол-тріомбразу: $\rho_3 - 1,11 \text{ г/см}^3$, $\rho_2 - 1,09 \text{ г/см}^3$ та $\rho_1 - 1,03 \text{ г/см}^3$ впродовж 10 хв при 500 g (Сибірна, Бурда, et al., 2006). При цьому клітини концентрувалися окремими шарами лімфоїдної, еритроїдної та гранулоцито-моноцитарної популяцій на межах розділення градієнтних розчинів. Відібрані фракції клітин лімфоїдної та гранулоцитарно-моноцитарної фракцій відмивали фізіологічним розчином і використовували для подальших досліджень.

2.25. Забарвлення мазків (Май-Грюнвальда-Романовського-Гимзи за Папенгеймом) та оцінка морфологічного складу клітин кісткового мозку

На сухий мазок кісткового мозку наносили 2 мл розчину барвника-фіксатора Май-Грюнвальда. Через 3 хв додавали однакову кількість дистильованої води і старанно перемішували на мазку. Коли мазок набував рожевого відтінку, барвник зливали і, не висушуючи його, дофарбовували свіжоприготовленим водним розчином барвника Романовського впродовж 8–15 хв. Потім барвник зливали, а мазок промивали водопровідною водою. Клітини кісткового мозку (не менше 500 на мазку) підраховували у різних полях зору і обчислювали відсотковий вміст кожного виду клітин (Сибірна, Бурда, et al., 2006).

2.26. Визначення кількості та добової продукції ретикулоцитів (Сибірна, Бурда, et al., 2006)

Зернисто-сітчасто-нитчасту субстанцію ретикулоцитів видно лише у випадку прижиттєвого фарбування, тобто без висушування і фіксації. До 0,08 мл 1% розчину діамантового крезилового синього додавали 0,02 мл цільної крові. Пробірку закривали гумовим корком. Через годину робили тонкий мазок цієї суміші на предметному склі. Після висихання мазок фіксували етиловим спиртом протягом 5-10 хв, а потім дофарбовували за Романовським - Гімза впродовж 45-60 хв. Ретикулоцити підраховували на 1000 еритроцитів,

результат виражали у проміле (‰).

Для визначення добової продукції ретикулоцитів у силіконізованій пробірці змішували 0,1 мл цільної крові з розчином $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (3,8 %) у співвідношенні 4:1. Суміш інкубували при 37°C протягом 4-х годин. Кількість ретикулоцитів підраховували як до, так і після інкубації.

Добову продукцію ретикулоцитів визначали за формулою:

$$\text{PR} = (\text{M} - \text{N}) \times \text{E} \times 6, \text{ де}$$

PR – продукція ретикулоцитів, в тис.;

M і N – кількість ретикулоцитів до та після інкубації, відповідно, ‰ ;

E – кількість еритроцитів, підрахованих у камері Горяєва, в тис.;

6 – коефіцієнт поправки на добу.

2.27. Фракціонування еритроцитів у градієнті густини сахарози (Сибірна, Бурда, et al., 2006)

Відомо, що густина еритроцитів змінюється зі старінням і визначається віком клітин. Рушійною силою фракціонування є піднімальна сила, що розподіляє еритроцити знизу вверх уздовж вертикальної осі колонки, залежно від густини. Еритроцитів розводили у 0,85 % NaCl у співвідношенні 1:10 і вносили в об'ємі 0,5 мл у скляну колонку діаметром 2,5 см. На суспензію клітин почергово нашаровували по 2 мл 30 %, 26 %, 22 %, 18 %, 14 %, 10 % та 6 % розчину сахарози. Отримували 7 клітинних фракцій, розподілених у градієнті густини сахарози в порядку зменшення їхньої густини. Проводили цитологічний контроль на вміст ретикулоцитів. Це дало змогу виділити 3 популяції еритроцитів: 1-ша популяція – „фізіологічно старі” – містила 0–5‰ ретикулоцитів; 2-га популяція – „фізіологічно зрілі” – 13–16 ‰ ретикулоцитів; 3-я популяція – „фізіологічно юні” – 20–23 ‰ ретикулоцитів.

2.28. Визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика (Сибірна, Бурда, et al., 2006)

Суть методу полягає у визначенні динаміки кількості клітин, що гемолізують за впливу кислотного гемолітика. Еритроцити розводили у 0,85 % NaCl до отримання екстинції 0,700 при довжині хвилі 630 нм. У термостатовану кювету вносили 1 мл робочої суспензії еритроцитів і додавали рівну кількість гемолізуючого розчину (0,004 н HCl у 0,85 % NaCl). Різницю між E_{630} на мінімумі ΔE і E_{630} після закінчення гемолізу приймали за 100 % гемолізованих еритроцитів. На основі отриманих значень будували криву залежності кількості (%) гемолізованих еритроцитів від часу гемолізу (еритрограму). Резистентність еритроцитів визначали за наступними параметрами: тривалість гемолізу (хв), пік гемолізу еритроцитів (хв), максимальна кількість гемолізованих еритроцитів за 0,5 хв (%).

2.29. Визначення агрегаційної здатності еритроцитів та лейкоцитів

Агрегаційну здатність еритроцитів та лейкоцитів досліджували турбідиметричним методом за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації „LA 230” в суспензії відмитих еритроцитів ($4,2 \times 10^6$ / мл) та лейкоцитів ($2,5 \times 10^6$ / мл) при 37°C і перемішуванні зі швидкістю 200 об/хв. Метод ґрунтується на тому, що відносна дисперсія коливань оптичної густини, викликаних випадковими змінами кількості агрегатів, що потрапляють на шлях лазерного променя, відображає відхилення від їхнього середнього розміру, ступінь асоціації. Максимальний ступінь агрегації визначали як максимальне значення світлопропускання після додавання індуктора, використовували програмне забезпечення AGGR V2.20.

Індукторами агрегації слугували: альціановий синій (Alcian blue) (7 мкг/мл) (Bulegenov & Balmukhanov, 1993) та лектини (10 мкг/мл) („Sigma”, США): WGA – лектин зародків пшениці, специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну (β -DGlcNAc) і N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuNAc); MAA –

лектин акації амурської, специфічний до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$) DGal/DGalNAc; SNA – лектин бузини чорної, специфічний до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$) DGal/DGalNAc (Антонюк, 2005).

2.30. Визначення вмісту сіалових кислот

При окисненні N-ацетилнейрамінової кислоти утворюється β -форміліпіруват, який при взаємодії з ТБК утворюючи забарвлений продукт, інтенсивність забарвлення якого пропорційна кількості N-ацетилнейрамінової кислоти (Jakubowska-Solarska & Solski, 2000).

Для отримання мембран еритроцити руйнували, використовуючи 5–7 мМ ЗФР (рН 8) протягом 1 год при 4 °С. Відмиті 4–6 разів 5 мМ Na-фосфатним буфером мембрани солубілізували, використовуючи додецилсульфат натрію (1 %). Відщеплення сіалових кислот від мембрани еритроцитів здійснювали шляхом м'якого кислотного гідролізу з використанням H_2SO_4 (0,2 н) впродовж 1 год, при температурі +80°С. Для визначення вмісту загальних мембранозв'язаних сіалових кислот використовували надосадову рідину, отриману після центрифугування при 6000 об/хв впродовж 8 хв.

Для відщеплення сіалових кислот від гліколіпідів спочатку відділяли фракцію ліпідів загальноприйнятим методом Фолча. Після чого зразки центрифугували при 2500 об/хв. Для дослідження використовували надосадову рідину, після чого проводили кислотний гідроліз, як описано вище.

До 0,2 мл досліджуваної проби додавали 0,1 мл 0,2 М розчину періодату натрію в 9 М H_3PO_4 . Паралельно робили контрольну пробу, де замість досліджуваного зразка додавали 0,2 мл води. Проби струшували і інкубували 40 хв при кімнатній температурі. Для усунення надлишку періодату до проби додавали 1 мл 10 % розчину арсеніту натрію та 1,5 мл 0,6 % 2-тіобарбітурової кислоти на 0,5 М Na_2SO_4 . Проби інкубували на киплячій водяній бані протягом 30 хв з наступним охолодженням. Для екстракції хромогену в пробірку додавали 2 мл циклогексану. Для кращої екстракції проби струшували і

центрифугували протягом 3 хв при 3000 об/хв. Верхня циклогексанова фаза забарвлювалася в рожевий колір, причому, забарвлення значно інтенсивніше ніж у водному середовищі. Забарвлену верхню циклогексанову фазу відділяли та визначали її оптичну густину на спектрофотометрі при 549 нм проти контролю. Концентрацію сіалової кислоти визначали за калібрувальним графіком в якості контролю використовували N-ацетилнейрамінову кислоту (Sigma, США) та виражають у мкмоль на мг білка.

2.31. Лектинензиматичний аналіз глікокон'югатів мембран еритроцитів

Метод базується на здатності лектинів специфічно зв'язуватися з вуглеводними детермінантами глікокон'югатів плазматичних мембран клітин, іммобілізованих на багатолунковому планшеті. Ступінь зв'язування виявляли в ензиматичній реакції за участю лужної фосфатази, міченої авідином, яка каталізує перетворення р-нітрофенілфосфату в продукт жовтого кольору р-нітрофенол. Дно лунок високоадсорбційної плоскодонної 96-лункової планшетки Nunc MaxiSorp покривали розчином полі-L-лізину, інкубували 1 год при 37°C. У лунки вносили по 0,05 мл суспензії еритроцитів ($2 \cdot 10^6$ / мл) та інкубували 1,5 год при 37°C. Клітини фіксували 0,025 % розчином глутаральдегіду впродовж 35 хв при кімнатній температурі, вносили по 0,05 мл біотинільованих лектинів у концентрації (3 мкг/мл) та інкубували 1 год при 37°C. У роботі використовували лектини: RCA – *лектин насіння рицини* (афінний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридних послідовностей DGal($\beta 1 \rightarrow 3(4)$)DGlcNAc, які зазвичай зустрічаються у структурі N-гліканів), PNA – *лектин насіння арахісу* (специфічний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридної послідовності DGal($\beta 1 \rightarrow 3$)DGlcNAc антигена Томсена-Фріденрайха, або Т-антигена. Т-антиген і Т-антиген-споріднені структури на поверхні еритроцитів представлені у вигляді О-зв'язаних гліканів), а також MAA та SNA (див. 2.28) (Лектинотест, Україна)) (Антонюк, 2005). Після цього вносили у кожну лунку по 0,05 мл

розчину лужної фосфатази, міченої авідином (розведення у 10 000 разів). Інкубували 1 год при 37°C, вносили розчин субстрату – р-нітрофенілфосфат і через 15 хв вимірювали оптичну густину при 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі EPOCH (США).

2.32. Визначення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів (Absolom, 1986; Stoika et al., 2001)

Для визначення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів як об'єкт фагоцитозу використовували дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (40×10^6 клітин /мл). До 0,4 мл отриманої суспензії дріжджів додавали 0,4 мл 2 % трипанового синього та інкубували 5 хв при 90 °C для інактивації об'єкту фагоцитозу. Після цього суспензію клітин відмивали від надлишку фарби, центрифугуванням при 1500 об / хв впродовж 5 хв. Отриманий осад пофарбованих дріжджів ресуспендували в 0,4 мл PBS і використовували для дослідження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів.

До 50 мкл лейкоконцентрату (3×10^6 клітин/мл) додавали 5 мкл робочої суспензії дріжджів. Клітини дріжджів інкубували при температурі 37°C, впродовж 30 та 120 хв, центрифугували обидві проби при 2000 об / хв впродовж 3 хв. З осаду виготовляли мазки, висушували і фіксували спочатку метанолом, потім 70 % етанолом та зафарбовували за Романовським-Гімза впродовж 40 хв.

За допомогою світлового мікроскопа підраховували кількість фагоцитуючих нейтрофільних гранулоцитів та кількість фагоцитованих клітин дріжджів. Розраховували фагоцитарний показник (ФП) – відношення середньої кількості клітин, що вступили у фагоцитоз до загальної кількості підрахованих нейтрофілів; ФЧ (фагоцитарне число) – середня кількість клітин дріжджів, поглинених фагоцитуючою клітиною та індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) – відношення середньої кількості поглинених клітин дріжджів через 30 хв інкубації до середньої кількості фагоцитованих клітин дріжджів через 120 хв інкубації.

2.33. Визначення бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів

2.33.1. Оцінка кисень-залежної бактерицидної активності нейтрофілів в реакції відновлення нітросинього тетразолію (Стасенко, 2021; Merzbach & Obedeanu, 1975)

Метод ґрунтується на відновленні АФО та АФН нітросинього тетразолію (НСТ) до нерозчинного темно-синього диформазану, який легко ідентифікувати у фагоцитах візуально.

До 50 мкл лейкоконцентрату додавали 20 мкл 0,2 % розчину НСТ. Пробірки струшували, інкубували 30 хв у термостаті при температурі 37 °С. Після інкубації готували мазки, фіксували метанолом та зафарбовували 2% розчином метилового зеленого впродовж 10 хв. Підрахунок результатів проводили за допомогою світлового мікроскопа, використовуючи імерсійний об'єктив.

Серед 100 клітин підраховували частку активованих нейтрофільних гранулоцитів (ЧАН, %), які містили гранули диформазану. За ступенем вираженості реакції активації нейтрофілів їх поділяли на чотири групи: H_0 – нейтрофіли без гранул; H_1 – включає нейтрофіли, у яких гранули займають $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{3}$ цитоплазми; H_2 – нейтрофіли, у яких вся цитоплазма заповнена гранулами, але наявні ділянки без гранул; H_3 – нейтрофіли, у яких цитоплазма вся заповнена гранулами, які перекривають ядро. За кількістю відкладеного в клітинах диформазану визначали їхню метаболічну активність обчислюючи індекс активації нейтрофілів (ІАН) (Лабудзинський & Шиманський, 2014): $ІАН = (1 \cdot H_0 + 2 \cdot H_1 + 3 \cdot H_2 + 4 \cdot H_3) / 100$, де H_0, H_1, H_2, H_3 (%) – кількість нейтрофілів кожної групи; 100 – кількість підрахованих клітин на мазку.

2.33.2. Дослідження мієлопероксидазної активності у нейтрофілах (Стасенко, 2021; Graham & Karnovsky, 1966)

Метод базується на окисненні бензидину в оксибензидин коричневого

забарвлення пероксидом гідрогену за участю мієлопероксидази (МПО).

З лейкоконцентрату виготовляли мазки, висушували, фіксували 4 % формаліново-спиртовим розчином (10 частин 40 % формаліну і 90 частин 96 % спирту) впродовж 30 с та змивали водою. Не висушуючи мазок, наносили на нього інкубаційну субстратну суміш (20 мг бензидину, 12 мл 96 % етанолу, 8 мл води, 0,04 мл 3 % пероксиду гідрогену) на 5–10 хв. Препарат змивали водою та фіксували 40 % етанолом. Ядра дофарбовували 5 % нейтральним червоним впродовж 1 хв. За вмістом оксибензидину нейтрофіли були поділені на групи: МПО⁺⁺⁺ – клітини з яскраво вираженим вмістом МПО; МПО⁺⁺ – клітини з помірним вмістом МПО; МПО⁺ та МПО⁻ – клітини з незначним вмістом або відсутністю МПО, відповідно.

Для кількісного вираження результатів підраховували 100 клітин. Кількість клітин з однаковою інтенсивністю забарвлення множили на кількість плюсів, що відповідає певній групі. Суму цих добутків виражали в умовних одиницях. Сума цих добутків, поділена на 100 представляє середній цитохімічний коефіцієнт (СЦХК), запропонований G. Astaldi, який є середньою відносною величиною вмісту мієлопероксидази, що виявляється в кожній окремій клітині.

2.33.3. Цитохімічне визначення вмісту катіонних протеїнів у нейтрофілах (*Беркало et al.*, 2003)

Вміст катіонних протеїнів (КП) виявляли за методикою, що базується на вибіркового забарвленні катіонних протеїнів бромфеноловим синім. Катіонні білки у цитоплазмі гранулоцитів знаходяться у вигляді синіх гранул.

З лейкоконцентрату виготовляли мазки, висушували, фіксували 5 % сульфосаліциловою кислотою впродовж 60–90 с. Одержані препарати зафарбовували 0,1 % бромфеноловим синім в боратному буфері впродовж 1–2 хв. Мазок висушували та дофарбовували гарячим 0,05 % основним фуксином (30 с). За інтенсивністю забарвлення цитоплазми лейкоцити поділяли на групи:

КБ⁺⁺⁺– клітини з яскраво вираженим вмістом катіонних протеїнів; КБ⁺⁺– клітини з помірною кількістю катіонних протеїнів; КБ⁺ та КБ[–] клітини із незначним вмістом або відсутністю катіонних протеїнів, відповідно. Обчислювали СЦХК (див. 2.32.2).

2.34. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали з допомогою програми Microsoft Excel. Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими в результаті досліджень (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Різницю показників оцінювали методами варіаційної статистики за критерієм Стьюдента і критерієм ANOVA (для непараметричних даних). Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$), знайдену після обчислення t за таблицею t -розподілу Стьюдента.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

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

Сучасне виробництво фармацевтичних препаратів та функціональних харчових продуктів, потребує обґрунтованого та цілеспрямованого використання не лише активних, але й допоміжних речовин з різними властивостями. Особливої уваги заслуговують поверхнево-активні речовини (сурфактанти), які впливають на агрегативну та седиментаційну стійкість компонентів препарату, забезпечуючи однорідність вмісту діючих речовин в одиниці дозованого лікарського засобу (ДФУ, 2015).

Сьогодні у світі прослідковується тенденція до відмови від використання синтетичних ПАР, натомість зростає комерційний інтерес до сурфактантів природного походження – біосурфактантів (Chern & Beutler, 1976; Müller et al., 2012; Plaisance et al., 2016; Semeniuk et al., 2020; A. Singh et al., 2007). Біосурфактанти характеризуються високою біологічною інертністю, на відміну від синтетичних, які можуть зумовлювати алергічні реакції та підвищувати токсичність препаратів. Окрім того, є дослідження, які підтверджують ефективність біосурфактантів, як антимікробних консервантів, у складі лікарських та косметичних засобів (Pelekh et al., 2017). Згідно вимог Державної фармакопеї України, у разі якщо готовий лікарський засіб не виявляє достатньої антимікробної дії, до його складу можуть бути включені антимікробні консерванти. Їхній вміст у фармакологічних препаратах не нормується ДФУ, проте, використані концентрації консервантів повинні бути чітко обґрунтованими (ДФУ, 2015).

Найперспективнішими є сурфактанти мікробного походження, перевагами яких є висока ефективність, що поєднується з біодеградабельністю і

низькою токсичністю (Mulligan, 2005). У науковій літературі є інформація про біосурфактанти різних класів (гліколіпіди, ліпопептиди, біополімери), їхні властивості та перспективи практичного застосування (Banat et al., 2010; Gharaei-Fa, 2010; Sekhon Randhawa & Rahman, 2014).

Серед перспективних мікроорганізмів-продуцентів сурфактантів значної уваги заслуговують представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні рамноліпіди з високою поверхневою, емульгувальною та піноутворювальною активністю. Рамноліпіди складаються з однієї або двох молекул рамнози, зв'язаних з двома залишками β -гідроксидеканової кислоти (Semeniuk et al., 2020).

Штам *Pseudomonas sp.* PS-17 може утилізувати широкий спектр органічних субстратів і синтезувати позаклітинні сурфактанти. Основними складниками одержаного мікробного комплексу поверхнево активних речовин є рамноліпіди (моно- і дирамноліпіди у співвідношенні 90:10), біополімер – альгінат, жирні кислоти, рамноза та амінокислоти. Масова частка вільної рамнози у складі рамноліпідів біопрепарату становить не менше 0,5 %. Встановлено, що рамноліпіди і екзополісахарид утворюють природну композицію – поверхнево-активний рамноліпідний біокомплекс. Цей комплекс є екологічно безпечним, має високу поверхневу активність, легко виділяється і може використовуватися як цільовий промисловий продукт (Покинсьборода, 2018; Semeniuk et al., 2020).

Біосурфактанти, які синтезуються штамом *Pseudomonas sp.* PS-17 мають в'язку консистенцію світло-зеленого чи світло-коричневого кольору зі слабким специфічним запахом. Масова частка сухої речовини складає не менше 1,9 %. Згідно з токсикологічним паспортом, середньосмертельна доза (LD_{50}) біосурфактанту PS-17 для білих щурів і мишей, за умови внутрішньошлункового введення культуральної рідини, становить більше 10 г/кг маси тіла, отже, цей біокомплекс належить до речовин 4 класу

небезпеки (Токсиколого-гігієнічний паспорт біопрепарату PS (біоПАР PS)., 2004).

На даний час немає подібних, стабілізованих додаванням біосурфактантів лікарських засобів, які б застосовувалися при лікуванні ЦД чи інших захворювань. Водночас результати, які отримані у різних наукових лабораторіях світу, дають підстави розглядати біосурфактанти, як альтернативу синтетичним (Rodrigues et al., 2006).

3.1.1. Отримання і стабілізація безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за допомогою біосурфактанту PS-17

З метою позбавлення екстракту *G. officinalis* від алкалоїдів, які є токсичними сполуками, нами було розроблено схему фракціонування та отримано хлороформну (безалкалоїдну) та водну (алкалоїдвмісну) фракції (див. розд. 2.4). Для первинної характеристики водної та хлороформної фракцій екстракту *G. officinalis* було проведено якісні загальноосадові реакції, за допомогою яких було підтверджено наявність алкалоїдів у складі водної фракції. При цьому нами не було виявлено алкалоїдів у складі хлороформної фракції (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Якісні загальноосадові реакції на алкалоїди

Якісні загальноосадові реакції на алкалоїди з використанням реактивів:	Екстракт <i>G. officinalis</i>	
	Водна фракція	Хлороформна фракція
Майєра	+	-
Драгендорфа	+	-
Бушарда	+	-
Зоненштейна	+	-

Зважаючи на наявність алкалоїдів у складі водної фракції екстракту *G. officinalis*, які є токсичними, детального фітохімічного аналізу її складу не

проводили, натомість нами було досліджено компонентний склад хлороформної (безалкалоїдної) фракції.

Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* має в'язку мазеподібну консистенцію, темно-зелене забарвлення, присмний запах, гіркуватий присмак. Цей екстракт добре розчиняється у метиловому та етиловому спиртах, нерозчиний в олії. При розчиненні у воді утворює темно-зелену 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 $28,77 \pm 2,47$ мг ГК/г екстракту.

Для оцінки токсичної дії безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* була обрана доза 5 г/кг маси тварини (максимальна доза четвертого класу токсичності (малотоксичні речовини)), яку вводили одноразово перорально щурам масою 150–180 г ($n=5$). (Коваленко В.М. та ін. 2001). Нами було показано, що після перорального введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 5 г/кг маси тіла ознак інтоксикації у щурів не виявлено, тварини були активними, реагували на світлові та звукові подразники; погіршення апетиту, порушення дихання та судом не спостерігали. Загибелі тварин впродовж усього періоду спостереження не зареєстровано.

Отже, проведені дослідження підтверджують, що значення LD_{50} для безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* є поза межами 5 г/кг маси тіла. Згідно з токсикологічною класифікацією речовин, безалкалоїдна фракція екстракту *G. officinalis* при пероральному введенні належить до V класу токсичності – практично нешкідливі речовини.

З метою покращення розчинності у воді, збереження біологічної активності та підвищення терапевтичного впливу завдяки ефективнішому засвоєнню діючих речовин нами було проведено стабілізацію безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* рамноліпідним біосурфактантом PS-17. До водної емульсії безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, яка є маслянистою рідиною та

налипає на стінки колби (рис. 3.1, А), додавали біосурфактант PS-17 у концентраціях 0,6, 2,0 і 3,3 г/л і струшували на вортексі. Ефективність емульгування зростала зі збільшенням концентрації біосурфактанту PS-17 до 3,3 г/л (рис. 3.1, Б – Г).

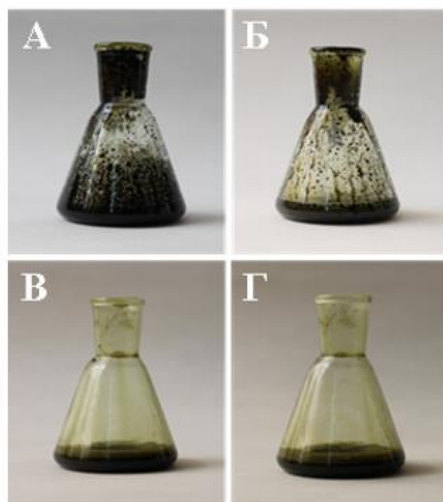


Рис. 3.1. Водна емульсія безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та її стабілізовані біосурфактантом PS-17 форми. Концентрація біосурфактанту PS-17 (г/л): А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л

Як видно з мікрофотографій (рис. 3.2), розмір частинок емульсії становив до 1 мкм. Частинки з таким розміром утворюють стійкі емульсії. 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 % (рис. 3.2, Б).

У разі застосування біосурфактанту PS-17 у концентраціях 2,0 та 3,3 г/л (рис. 3.2, В, Г) було отримано дрібнодисперсні емульсії (середній розмір крапель менше 1 мкм) кількість яких становила до 80 %. Ці емульсії є стійкими і не розшаровувалися більше 30 діб.

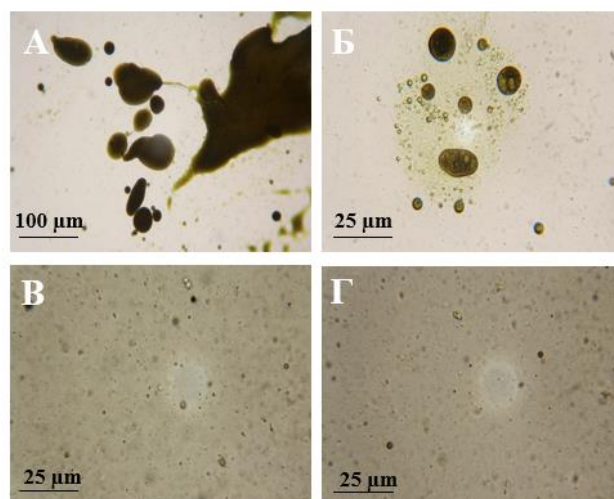


Рис. 3.2. Мікрофотографії нестабілізованого та стабілізованого біосурфактантом PS-17 безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*. Концентрація біосурфактанту PS-17 (г/л): А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л

Отже, додавання біосурфактанту PS-17 у концентрації 3,3 г/л до вихідної емульсії безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* дає змогу отримати стійкі дрібнодисперсні емульсії. Такі емульсії легше вводити через зонд піддослідним тваринам, що забезпечує чітке дотримання певного дозування діючих речовин фітопрепарату.

3.1.2. Дослідження компонентного складу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, стабілізованого біосурфактантом PS-17

При дослідженні компонентного складу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, стабілізованого сурфактантом PS-17 (далі по тексті – безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*) за допомогою методу газової хроматомаспектрометрії було ідентифіковано 27 сполук, а саме: вищі жирні кислоти та їхні естери (63,9 %), моно- (1,4 %), ди- (5,6 %) і тритерпени (2,3 %), фітостероли (17,3 %), флавоноїди (3,0 %) та вітамін Е (0,5 %) (рис. 3.3, табл. 3.2).

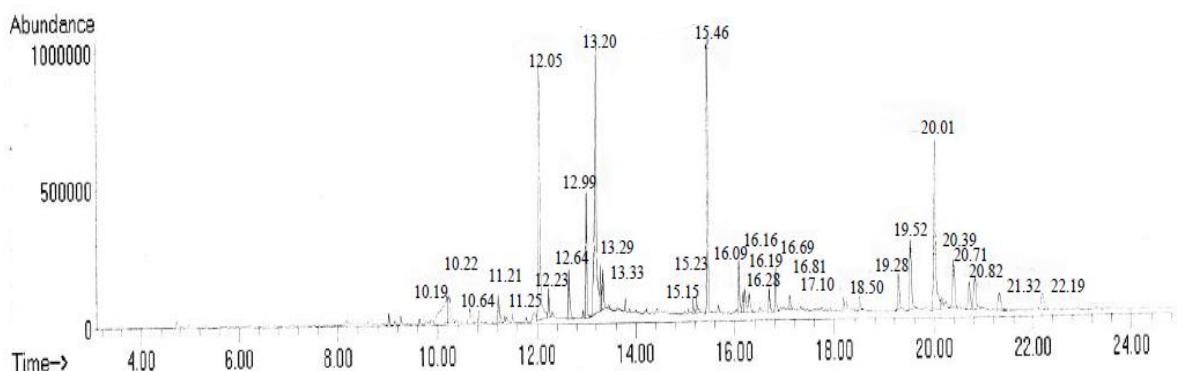


Рис. 3.3. Хроматограма компонентів безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Встановлено, що домінуючими компонентами досліджуваного екстракту є метиловий ефір ліноленової кислоти (33,0 %), а також пальмітинова кислота й етиловий естер пальмітинової кислоти (15,5 %). У складі стабілізованого екстракту було ідентифіковано низку жирних кислот, зокрема, 2-додеценову (4,3 %), 2-деценову (88,2 %), а також метиловий естер 2-деценової кислоти (3,8 %). Також у складі екстракту виявлено 2-етилгексил ізогексиловий естер фталевої кислоти (2,8 %), інозитол (3,1 %) та 2 – метил- 1,2,3а,4,5 – гексагідропіроло – [1,2-а] хіназолін (2,9 %).

За допомогою методу хроматомаспектрометрії у складі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* було ідентифіковано флавоноїди: 3-(2,4- диметоксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-1-бензопіран-7-ол (1,9 %) та 6а,12а-дигідро-6Н-(1,3)діоксоло(5,6)бензофуоро(3,2-с)хромен-3-ол (1,1 %) та фітостероли – кампестерол (1,9 %) та стігмастерол (14,7 %). Окрім того, у досліджуваному екстракті було виявлено низку терпенів – монотерпен лоліолід (1,4 %), дитерпени – неофітадієн (1,9 %) і фітол (3,7%) та тритерпени – сквален (0,3 %) і α -амірин (1,9 %) (табл. 3.2., рис. 3.3).

Таблиця 3.2

Компонетний склад безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

№ піку	Час виходу, хв	Сполука	Площа піку, %
1.	8,1	2-Деценева кислота, метиловий естер	10,5
2.	8,4	2-Деценева кислота	1,35
3.	9,6	2(4Н)-Бензофуранон	0,6
4.	9,9	2-Додеценева кислота	0,4
5.	10,2	Інозитол	3,1
6.	10,6	Міристинова кислота	0,4
7.	10,8	4-Метиламінофенол	0,4
8.	11,2	Неофітадієн	1,0
9.	11,45	Лоліолід	1,3
10.	12,1	Пальмітинова кислота, етиловий естер	10,9
11.	12,2	Пальмітинова кислота, етиловий естер	3,0
12.	12,5	2 – метил- 1,2,3а,4,5 – гексагідропіроло – [1,2-а] хіназолін	3,0
13.	12,9	Фітол	3,7
14.	13,2	9,12,15-Ліноленова кислота, метиловий ефір	33,0
15.	13,3	9,12,15-Октадекатрієн-1-ол, (Z Z,Z)-	0,2
16.	15,2	Пальмітинова кислота, 2-гідрокси-1-(гідроксиметил) етиловий естер	1,6
17.	15,5	Фталева кислота, 2-етилгексил ізогексиловий естер	2,8
18.	16,1	2Н-1-Бензопіран-7-ол, 3-(2,4- диметоксифеніл)-3,4-дигідро-	1,9
19.	16,3	6а,12а-Дигідро-6Н-(1,3)діоксоло(5,6)бензофуоро(3,2-с)хромен-3-ол	1,1
20.	16,8	Сквален	0,3
21.	18,5	Вітамін Е	0,5
22.	19,3	Кампестерол	2,0
23.	19,5	Стігмастерол	4,0
24.	20,1	Стігмастерол	10,6
25.	20,7	9,19-Циклоергост-24(28)-єн-3-ол, 4,14,-диметил-, (3.бета.,4.альфа.,5.альфа.) -	0,6
26.	20,8	α-Амірин	1,9
27.	22,2	Неофітадієн	0,9

Дослідження сполук фенольної природи у складі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* здійснювали методом ультраефективної рідинної

хроматографії в поєднанні з електроспрей-іонізаційним мас-спектрометром (UHPLC-ESI-MS) (табл 3.3).

Таблиця 3.3

UPLC-ESI-MS аналіз безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* (дані MS, отримані в режимі негативної іонізації – псевдомолекулярний іон $[M-H]^-$)

№	tR, min	Сполуки	mass observed $[M-H]^-$	Вміс мкг/г сухої ваги
<i>Фенольні кислоти та їхні похідні</i>				
1	4,6	Гексозид галової кислоти	331,02	43,21±0,53
2	11,6	<i>n</i> -Гексозид гідробензойної кислоти	299,07	31,69±0,46
3	7,1	<i>n</i> -Кумарова кислота	163,01	13,55±0,20
4	7,5	Ферулова кислота	193,02	8,87±0,11
5	8,6	Бензойна кислота	121,04	3,11±0,02
6	8,7	Саліцилова кислота	137,02	4,02±0,01
7	9,5	<i>Транс</i> -корична кислота	147,02	13,89±0,22
<i>Флавоноїди та їхні похідні</i>				
1	7,2	Кверцетин 3-О-глюкозид	463,06	17,32±0,27
2	7,2	Кверцитин 3-О-рамнозид	447,07	5,08±0,12
3	8,8	Лютеолін	285,01	3,80±0,06
4	9,5	Апігенін	269,01	0,46±0,01
5	6,6	Мірицитин 3-О-глюкозид	479,06	3,16±0,01
6	9,69	Кемпферол	285,01	1,25±0,10
7	9,7	Хризин	253,02	0,61±0,01
<i>Антоціани та їхні похідні</i>				
1	8,4	Пеонідин-3-О- глюкозид	463,02	228,23±2,88

За результатами хроматографічного аналізу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* поліфенольні компоненти цього екстракту було поділено на три

групи: фенольні кислоти та їхні похідні ($118,34 \pm 1,54$ мкг/г сухої ваги), флавоноїди та їхні похідні ($31,68 \pm 0,56$ мкг/г сухої ваги) й антоціани та їхні похідні ($228,23 \pm 2,88$ мкг/г сухої ваги) (див. табл 3.2).

У першій групі було ідентифіковано 8 фенольних кислот та їхніх похідних. Серед них виявлено найбільшу кількість гексозиду галової кислоти з [М - Н]⁻ за m / z 331,02 та n-гексозиду гідробензойної кислоти з [М - Н]⁻ за m / z 299,07, а також. n-кумарову з [М - Н]⁻ за m / z 193,02 і транс-коричну з [М - Н]⁻ за m / z 147,02 кислоти. Крім того, було визначено ферулову кислоту з [М - Н]⁻ за m / z 194,18.

У другій групі речовин, представлених флавоноїдами було ідентифіковано два похідні кверцетину з псевдомолекулярними іонами за m / z 463,06 та 447,07, відповідно. Сполуки 6, 11 і 12 було ідентифіковано як лютеолін, мірицитин 3-О-глюкозид та кемпферол з псевдомолекулярними іонами за m / z [М - Н]⁻ 285,01, 479,06 та 285,01 відповідно.

У третій групі речовин було ідентифіковано представник антоціанів – пеонідин-3-О- глюкозид з псевдомолекулярним іоном 463,02.

Варто зазначити, що серед ідентифікованих є біологічно активні сполуки з потенційною гіпоглікемічною (фітол, етиловий естер пальмітинової кислоти, фітостероли – кампестерол і стігмастерол та похідні хіназоліну) (Elmazar et al., 2013; Islam et al., 2018; Upadhyay et al., 2022), антиоксидатною (фітол, флавоноїди та вітамін Е) (Islam et al., 2018; Pietta, 2000) та протизапальною дією (метиловий естер ліноленової кислоти, флавоноїди, α-амірин (Coniglio et al., 2023)).

3.1.3. Розробка способу отримання стабільної суспензії на основі порошку кореневих бульб *S. sonchifolius*

При змішуванні порошку кореневих бульб *S. sonchifolius* з водою отримували грубу суспензію з розміром частинок $5 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$ см. Така

суспензія є седиментаційно нестійкою – через 15 хв розшаровувалася і частинки порошку кореневих бульб осідали (рис. 3.4).

Седиментаційно стійкі суспензії на основі порошку кореневих бульб *S. sonhifolius* отримували при додаванні біосурфактанту PS-17 у концентраціях 0,01; 0,02 та 0,03 г/л (рис. 3.4). У разі застосування біосурфактанту PS-17 у концентрації 0,03 г/л мл суспензія залишалася седиментаційно стійкою впродовж 15 хв. При додаванні біосурфактанту PS-17 у нижчих концентраціях (0,02 г/л та 0,001 г/л) отримували результат, практично аналогічний попередньому. Таким чином, для стабілізації цього фітопрепарату достатньо використовувати біосурфактант PS-17 у найменшій концентрації 0,01 г/л.

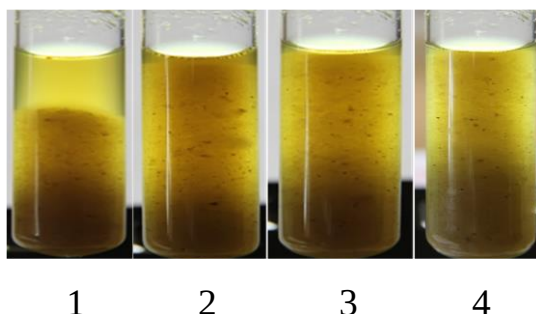


Рис. 3.4. Водні суспензії порошку *S. sonhifolius* через 15 хв після приготування. Концентрація біокомплексу PS (г/л): 1 – 0 (контрольна суспензія); 2 – 0,01 г/л; 3 – 0,02 г/л; 4 – 0,03 г/л

У разі додавання до контрольної суспензії біосурфактанту PS-17 у всіх досліджуваних концентраціях, встановлено підвищення змочуваності частинок порошку *S. sonhifolius*, що перешкоджає їхній адсорбції на стінках скляних пробірок (рис. 3.5). Найвища концентрація біосурфактанту PS-17 зумовлює найкращу змочуваність частинок порошку, але і нижчі концентрації є достатніми для отримання стабільних суспензій.

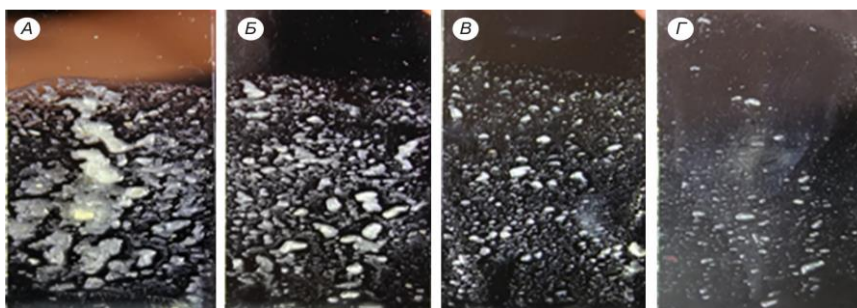


Рис. 3.5. Налипання суспензій порошку *S. sonhifolius* на стінках пробірок. Концентрація біосурфактанту PS-17: 1 – 0 (контрольна суспензія); 2 – 0,01 г/л; 3 – 0,02 г/л; 4 – 0,03 г/л

Оскільки на першому етапі дослідження встановлено, що для підвищення стійкості суспензії достатньо використовувати найменшу досліджувану концентрацію (0,01 г/л) біосурфактанту PS-17, нами було запропоновано до сухого порошку кореневих бульб якона додавати біосурфактанту PS-17 саме у цій концентрації. Встановлено, що порошок після додавання стабілізатора та висихання не змінює свого вигляду (рис. 3.6).



Рис. 3.6. Порошок *S. sonhifolius* (I): А – без обробки; Б – після попередньої обробки біосурфактантом PS-17 у концентрації 0,01 г/л. Водні суспензії кореневих бульб *S. sonhifolius* (II): 1 – контрольна суспензія; 2 – суспензія приготована на основі порошку *S. sonhifolius*, який був попередньо змішаний з біосурфактантом PS-17

Отже, обидва запропоновані способи отримання стабілізованої субстанції на основі кореневих бульб *S. sonhifolius* (з додаванням біосурфактанту PS-17 до суспензій порошку кореневих бульб та з додаванням до порошку кореневих

бульб біосурфактанту PS-17) дають змогу отримати водні суспензії, які є седиментаційно стабільними упродовж 15 хв.

Висновки до розділу 3.1

Розроблено способи отримання седиментаційно стійких фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та порошку кореневих бульб *S. sonchifolius*, які можуть слугувати основою антидіабетичних лікарських засобів та функціональних харчових продуктів, застосовуючи біосурфактант PS-17. Стабілізація досліджуваних фітопрепаратів дає змогу забезпечити чітке дозування діючих речовин.

Публікації:

Статті:

1. Хохла М. Дослідження компонентного складу екстракту козлятника лікарського / М. Хохла, Г. Клевета, М. Лупак, О. Канюка, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірня // Вісн. Львів. Ун-ту, Сер. біол. – 2013. – Вип. 62. – С. 55–60. http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2013_62_9.

2. Горбулінська О. В. Розробка способу отримання стабільних субстанцій для функціональних харчових продуктів на основі порошку кореневих бульб *S. sonchifolius* а (*Smallanthus sonchifolius* Poir. & Endl.) та дослідження їхньої цукрознижувальної активності у щурів / О. В. Горбулінська, М. Р. Хохла, А. Р. Зинь, Г. Я. Гачкова, Н. О. Сибірня // Біологічні студії. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 33–44. http://nbuv.gov.ua/UJRN/bist_2016_10_2_5.

3. 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. Сибірня // Біологічні Студії. – 2015. – 9, № 1. – С. 5 – 16. http://nbuv.gov.ua/UJRN/bist_2015_9_1_4.

Патенти на корисну модель:

1. Сибірна Н. О., Гачкова Г. Я., Хохла М. Р. “Спосіб одержання безалкалоїдного екстракту з козлятника лікарського з антидіабетичною дією”, № 96839 від 25.02.15, заявник Львівський національний університет імені Івана Франка. <https://uapatents.com/5-96839-sposib-oderzhannya-bezalkalodnogo-ekstraktu-z-kozlyatnika-likarskogo-z-antidiabetichnoyu-diehyu.html>.

2. Сибірна Н., Вільданова Р., Ш., Щеглова Н., Карпенко О., Хохла М., Гачкова Г., Лупак М. Спосіб отримання фітопрепарату на основі безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) № 101202 від 25.08.15, заявник Львівський національний університет імені Івана Франка. <https://uapatents.com/6-101202-sposib-otrimannya-fitopreparatu-na-osnovi-bezalkalodno-frakci-ekstraktu-kozlyatniku-likarskogo-galega-officinalis-l.html>.

3.2. Гіпоглікемічна дія водних екстрактів і суспензій *S. sonhifolius* а та безалкалоїдної фракції екстракту *G. officinalis*

З метою пошуку перспективного джерела антидіабетичних фітокомпонентів нами було досліджено гіпоглікемічні властивості екстрактів *S. sonhifolius* та *G. officinalis*. Вченими з різних країн світу, де інтродуковано *S. sonhifolius*, встановлено, що антидіабетичні властивості головно притаманні водним екстрактам листків і кореневих бульб цієї рослини (Lachman et al., 2003a; Simonovska et al., 2003; Valentova et al., 2016). Нещодавно *S. sonhifolius* було інтродуковано в Україні (Міщенко Л. Т., 2012). Відтак, нами було проведено скринінгове дослідження гіпоглікемічної дії водних екстрактів надземної (листя, стебла, черешки) та кореневої (кореневі бульби та шкірки кореневих бульб) частин *S. sonhifolius* української інтродукції, з метою виявлення частин рослини, що мають найвираженіші гіпоглікемічні властивості.

Для оцінки ефективності гіпоглікемічної дії екстрактів *S. sonhifolius* у дозі 70 мг / кг проводили пероральний тест толерантності до глюкози (ПТТГ). Максимальне підвищення концентрації глюкози в крові контрольних тварин (у 3 рази щодо початкового рівня) відмічено на 20-ту хв після глюкозного навантаження. У тварин цієї групи рівень глюкози нормалізувався через 1 год від моменту введення глюкози (рис. 3.7).

Підтверджено виражену антигіперглікемічну дію екстрактів, отриманих з надземної частини *S. sonhifolius*. При одноразовому введенні водних екстрактів *S. sonhifolius* одразу після навантаження глюкозою показано зниження її рівня на 20-ту хв на 40 % (листки), 64 % (черешки), 37 % (стебла) щодо контролю. У разі застосування екстрактів з листя і стебел *S. sonhifolius*, рівень глюкози нормалізувався через 1 год з моменту глюкозного навантаження, що було характерно і для тварин контрольної групи. За умов введення екстракту черешків відмічено пік концентрації глюкози зсувався з 20-ї на 60-ту хв (рис. 3.7).

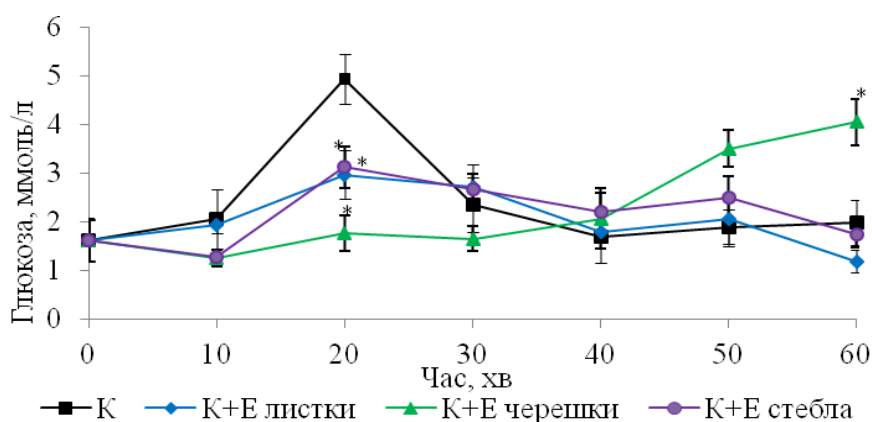


Рис. 3.7. Глікемічні криві здорових щурів за умов введення екстрактів надземної частини *S. sonhifolius*. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$

Глікемічні криві, які наведені на рис. 3.8 демонструють значну гіпоглікемічну дію водних екстрактів кореневих бульб *S. sonhifolius* – концентрація глюкози знижувалася на 45,8 % (20 хв), 37,2 % (30 хв), 34,1 % (40 хв), 35,5 % (50 хв) і на 24,6 % (60 хв), порівняно з контролем. Виражену

гіпоглікемічну дію виявляв також екстракт шкірок кореневих бульб – глікемічний пік знижувався на 42,3 % (20 хв), щодо контролю.

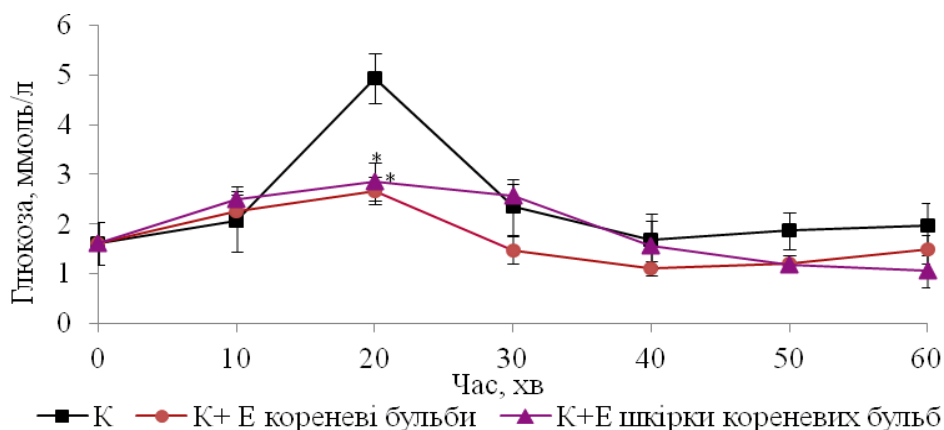


Рис. 3.8. Глікемічні криві здорових щурів за умов введення екстрактів кореневої частини *S. sonhifolius*. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$

Для оцінки сумарної відповіді на глюкозотолерантний тест розраховували площу під глікемічними кривими (AUC_{glu}). При введенні екстракту листків *S. sonhifolius* здоровим тваринам встановлено зниження AUC_{glu} на 30,2 %, екстрактів черешків і стебел – на 20,7 і 17,2 %, відповідно. У разі застосування екстрактів кореневих бульб та шкірок кореневих бульб AUC_{glu} знижувалася на 39,4 та 29,9 % щодо контролю (рис. 3.9).

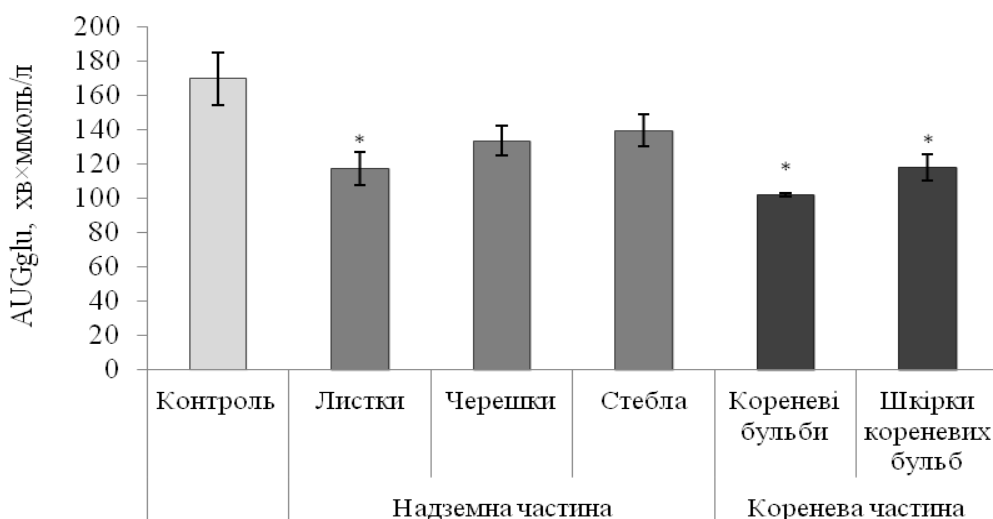


Рис. 3.9. Вплив водних екстрактів надземної та кореневої частин *S. sonhifolius* на площу під глікемічними кривими після глюкозного навантаження щурів. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$

Таким чином, при одноразовому введенні водних екстрактів отриманих з різних частин *S. sonhifolius* у дозі 70 мг/кг контрольним тваринам, встановлено, що найкращу гіпоглікемічну дію виявляли екстракти кореневих бульб та листків *S. sonhifolius* (стебла < черешки < шкірки кореневих бульб < листки < кореневі бульби). Зниження рівня постпрандіальної глікемії у разі застосування досліджуваних екстрактів може бути зумовлене підвищенням толерантності до глюкози у зв'язку з повільнішим її всмоктуванням зі шлунково-кишкового тракту (ШКТ), що зумовлює рівномірніше навантаження на інсулярний апарат впродовж усього процесу травлення. Підземні органи *S. sonhifolius* накопичують фруктани типу інуліну β (2 $\rightarrow$ 1) (понад 60 % на суху речовину) (Lachman et al., 2003a) (Lachman et al., 2003a), фруктозу (3–22 % на суху речовину) та глюкозу (2–5 % на суху речовину) (Ohyama et al., 1990), хлорогенову кислоту, триптофан (Castro et al., 2012; Lachman et al., 2007; Yan et al., 1999). Фруктоолігосахариди мають обволікаючі властивості, завдяки чому затримують всмоктування вуглеводів у ШКТ (Rolim et al., 2011). Листки та стебла *S. sonhifolius* містять низку поліфенолів (кофеїн, хлорогенова і ферулова кислоти, флавоноїди, серед яких кверцетин) (Valentova et al., 2016), які можуть зумовлювати гіпоглікемічну дію.

З огляду на те, що використання води як екстрагенту БАР з рослинної сировини не забезпечує екстрагування гідрофобних речовин, нами також було досліджено рослинну субстанцію у формі суспензії кореневих бульб *S. sonhifolius*. Суспензія містить у своєму складі розчинні та нерозчинні у воді компоненти рослинної сировини, що визначає ширший спектр їхньої дії.

Нестабілізована та стабілізована форми суспензії кореневих бульб *S. sonhifolius* виявляють виражений гіпоглікемічний ефект за умов їхнього введення здоровим тваринам – площа під глікемічними кривими знижувалася на 17,8 % та 19,8 %, відповідно (рис. 3.10).

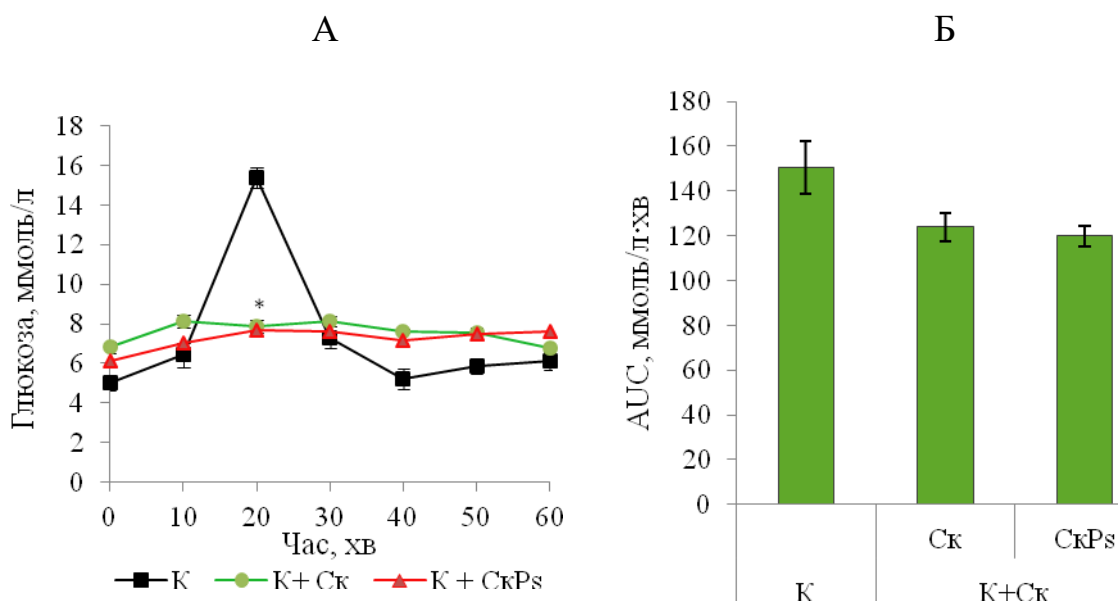


Рис. 3.10. Глікемічні криві здорових щурів при введенні суспензії кореневих бульб *S. sonhifolius* (Ск) та її стабілізованої форми (СкPs) (А); Площа під глікемічними кривими за досліджуваних умов (Б). * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$.

Незважаючи на те, що при одноразовому введенні екстракту листя *S. sonhifolius* у дозі 70 мг/кг контрольним тваринам, встановлено виражений гіпоглікемічний ефект, проте, за умов двотижневого введення цього екстракту тваринам з ЕЦД подібного ефекту не відмічено (рис. 3.11, Б; рис. 3.12). При підвищенні дози екстракту листя *S. sonhifolius*, який вводили тваринам з ЕЦД до 500 мг/кг вихідний рівень глюкози знижувався на 40,1 % щодо діабету і утримувався практично на тому ж рівні впродовж години. Площа під глікемічними кривими при введенні екстракту листя у дозі 500 мг/кг знижувалася на 44,1 %, порівняно з ЕЦД (рис. 3.11, Б). Таким чином, підтверджено вираженіший гіпоглікемічний ефект водного екстракту листя у дозі 500 мг/кг маси тіла тварини за досліджуваної патології. Введення контрольним тваринам водного екстракту листя у досліджуваних концентраціях зумовлювало зменшення глікемічного піку на 20-ту хв (рис. 3.11,

А). Незважаючи на зміну динаміки рівня глюкози в крові, показник AUC_{glu} істотно не відрізнявся від контрольних значень (рис. 3.12).

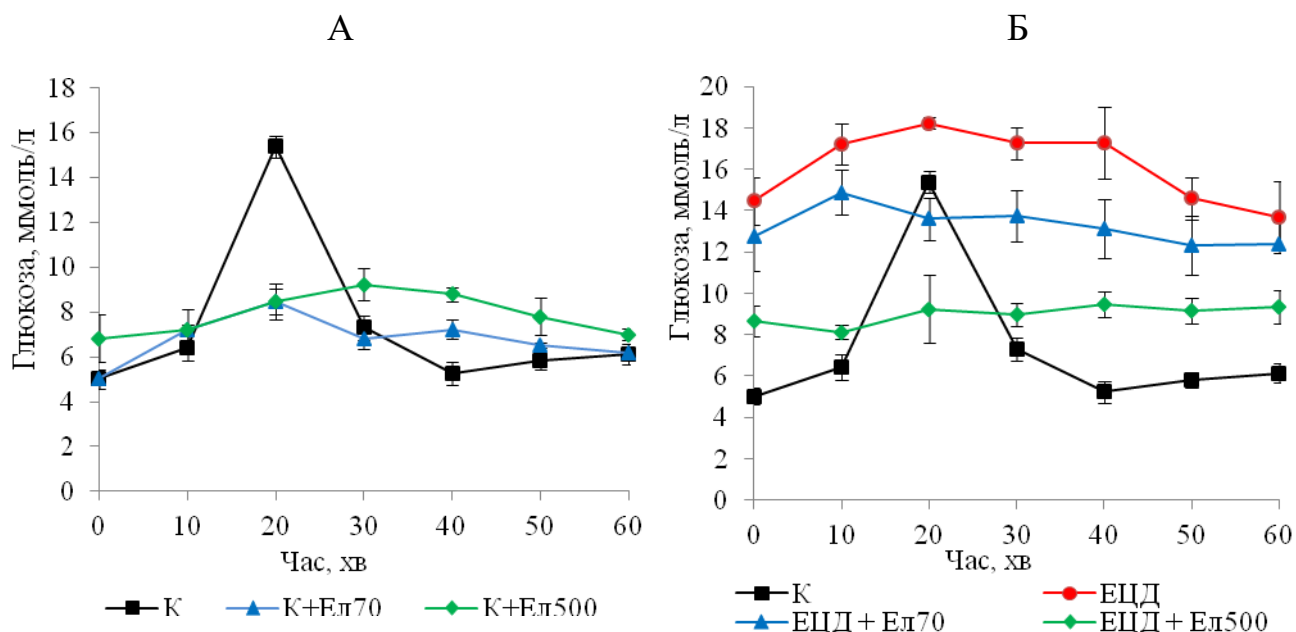


Рис. 3.11. Глікемічні криві здорових (А) та тварин з ЕЦД (Б) після глюкозного навантаження на фоні введення водного екстракту листя (Ел) *S. sonhifolius* а у дозах 70 та 500 мг/кг

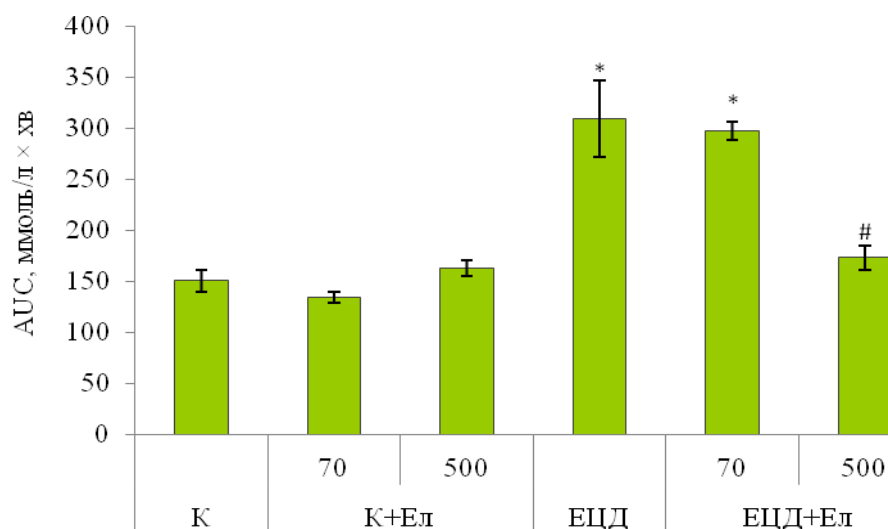


Рис. 3.12. Площа під глікемічними кривими у разі введення водних екстрактів листя *S. sonhifolius* контрольним тваринам та тваринам з ЕЦД. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$; *# – різниця вірогідна, порівняно з контролем та з ЕЦД

Введення водного екстракту кореневих бульб *S. sonhifolius* а у дозах 70 та 500 мг/кг призводило до зниження вихідного рівня глюкози на 28,5 % та на 54,0 % відповідно, порівняно з ЕЦД. Застосування екстрактів у досліджуваних концентраціях зумовлювало подібні зміни характеру глікемічних кривих: зростання концентрації глюкози на 20-ту хвилину після вуглеводного навантаження та поступове зниження її рівня до вихідного значення (50 хв) (рис. 3.13, А). Екстракт кореневих бульб *S. sonhifolius* а у вищій дозі (500 мг/кг) ефективніше знижував AUC_{glu} у тварин з ЕЦД – на 34,1 %, натомість при введенні екстракту у дозі 70 мг/кг – цей показник знижувався на 24,8 % порівняно з діабетом (рис. 3.15).

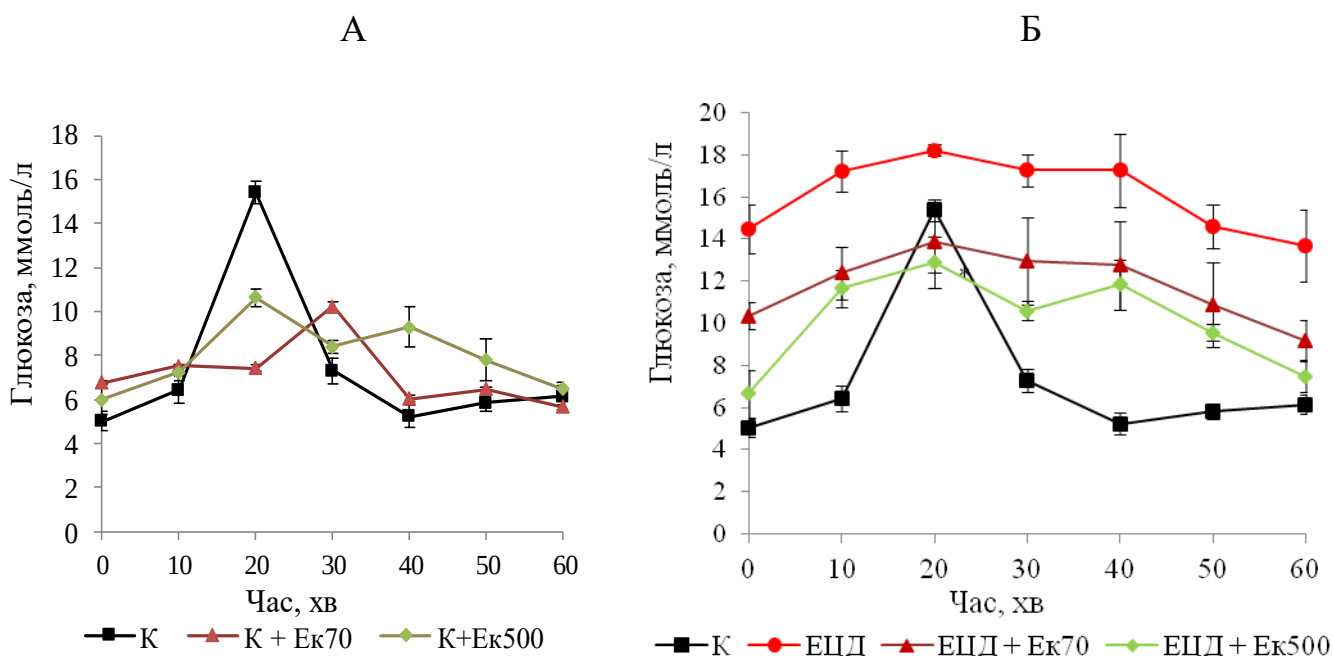


Рис. 3.13. Глікемічні криві здорових (А) та тварин з ЕЦД (Б) після глюкозного навантаження на фоні введення водного екстракту кореневих бульб (Ек) *S. sonhifolius* у дозах 70 та 500 мг/кг

Застосування нестабілізованої та стабілізованої біосурфактантом PS-17 суспензії кореневих бульб *S. sonhifolius* у дозі 500 мг/кг зумовлювало зниження вихідного рівня глюкози, відповідно на 39,3 % та 40,1 %. Після глюкозного навантаження на тлі введення нестабілізованої форми суспензії рівень глюкози максимально підвищувався на 10–20 хвилини з подальшим зниженням до

вихідного рівня вже на 40-ву хв експерименту. Використання стабілізованої форми суспензії зумовлювало незначне зростання вмісту глюкози лише на 10 хв, а починаючи з 20 хв – зниження до вихідних значень (рис. 3.14, Б).

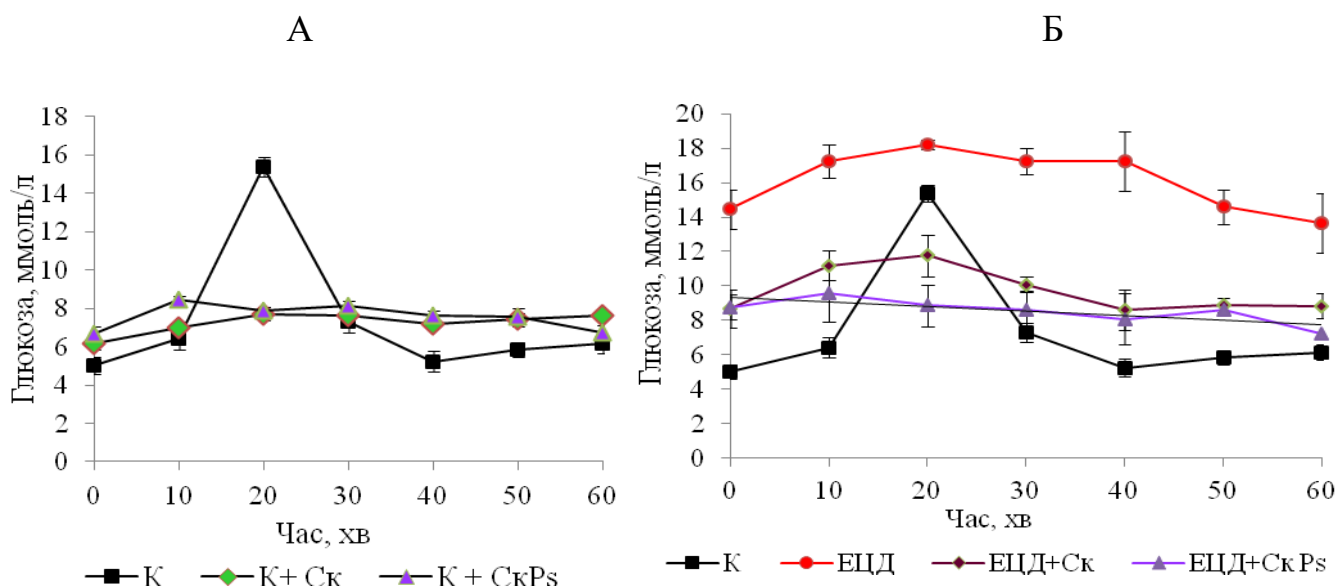


Рис. 3.14. Глікемічні криві здорових (А) та тварин з ЕЦД (Б) після глюкозного навантаження на фоні введення водного екстракту кореневих бульб (Ек) *S. sonhifolius* у дозах 70 та 500 мг/кг

На рис. 3.15 показано зниження показника AUC_{glu} при введенні стабілізованої і нестабілізованої форм суспензій *S. sonhifolius* відповідно на 47,0 % та 43,2 %, порівняно з ЕЦД (рис. 3.15).

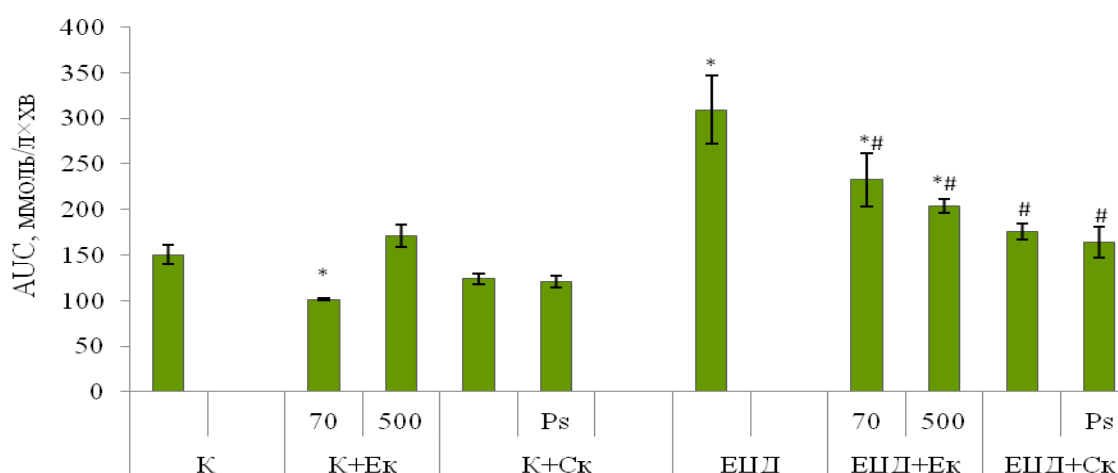


Рис. 3.15. Площа під глікемічними кривими у тварин з ЕЦД у разі введення водних екстрактів (Ек) та суспензій кореневих бульб (Ск) *S. sonhifolius* у стабілізованій (Ps) та нестабілізованій формах тваринам з ЕЦД

Для виявлення препарату з найбільш вираженим гіпоглікемічним ефектом нами також було проаналізовано вміст глюкози та глікозилизованого гемоглобіну після 14-денного застосування досліджуваних екстрактів і суспензій *S. sonhifolius* (рис. 3.16-3.17).

Досліджуючи гіпоглікемічну дію екстрактів листя та корневих бульб *S. sonhifolius* у дозі 70 та 500 мг/кг при курсовому введенні тваринам з ЕЦД, встановлено, що застосування екстрактів у вищій концентрації (500 мг/кг) зумовлює вираженіший ефект. Екстракт корневих бульб *S. sonhifolius* найефективніше знижує концентрацію глюкози, порівняно з екстрактом листя та суспензією корневих бульб. Цікавим є те, що у здорових тварин рівень глюкози підвищується при введенні водного екстракту корневих бульб у дозі 500 мг/кг та суспензій корневих бульб *S. sonhifolius* (рис. 3.16). Це може бути зумовлено наявністю у складі корневих бульб цієї рослини глюкози (2–5 % на суху речовину) (Ohyama et al., 1990).

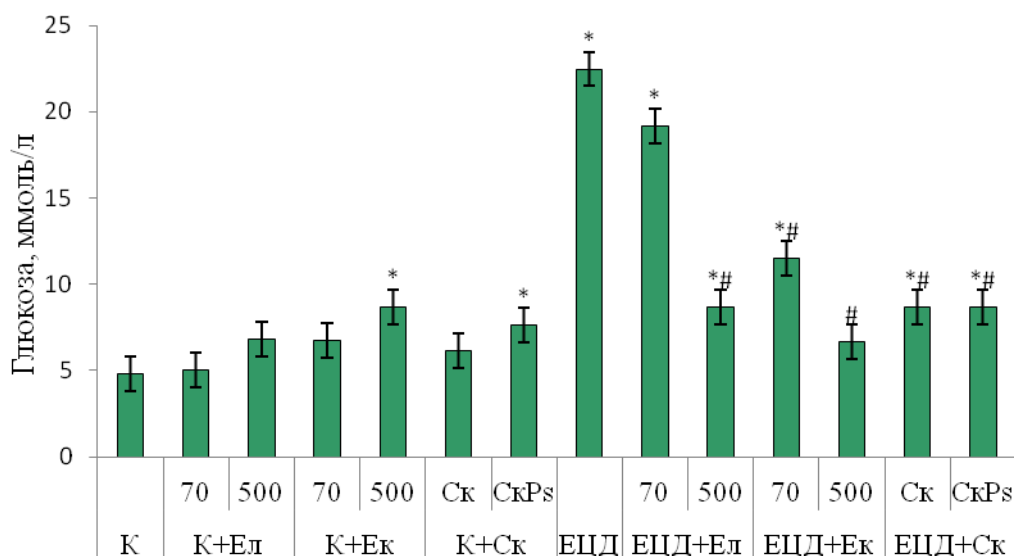


Рис. 3.16. Концентрація глюкози у крові щурів за умов введення екстрактів листя і корневих бульб та суспензій корневих бульб *S. sonhifolius* тваринам з ЕЦД. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Інтегральним показником компенсації вуглеводного обміну при ЦД є глікозований гемоглобін (HbA1c). Концентрація HbA1c корелює з рівнем глюкози і характеризує середню концентрацію цього моносахариду у крові впродовж тривалого часу (1-2 місяці), а також відображає ризик розвитку ускладнень цієї патології (Ohde et al., 2018). Вміст HbA1c знижувався (на 24,3 %) лише при введенні екстракту корневих бульб *S. sonchifolius* тваринам, хворим на ЦД (рис. 3.17).

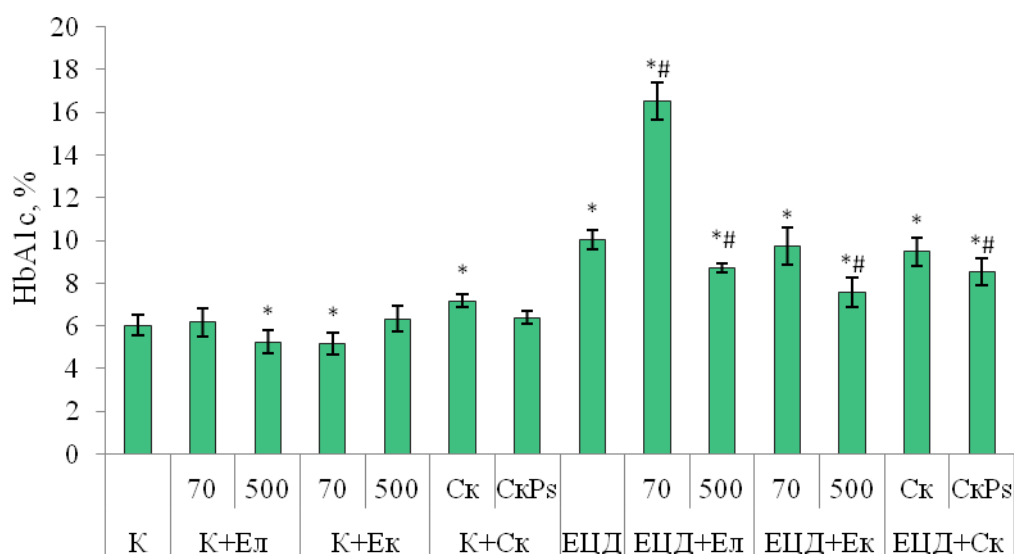


Рис. 3.17. Концентрація глікованого гемоглобіну у крові щурів за умов введення екстрактів листя і корневих бульб та суспензій корневих бульб *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Таким чином, суспензії корневих бульб *S. sonchifolius* найефективніше знижують постпрандіальний рівень глікемії, про що свідчить зниження площі під глікемічними кривими, а екстракт корневих бульб – базальний рівень глікемії, який оцінювали за вмістом глюкози і глікованого гемоглобіну.

Ще однією перспективною рослиною для створення антидіабетичних препаратів природного походження є *G. officinalis* (Bednarska et al., 2020; Seyd-Hosein Abtahi-Evari, 2017; Vergun et al., 2020).

При введенні нестабілізованої та стабілізованої форм безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* здоровим тваринам вміст глюкози у крові практично не змінювався, проте знижувався до значень фізіологічної норми у разі введення тваринам з діабетом (на 39 та 37 % щодо діабету, відповідно) (рис. 3.18).

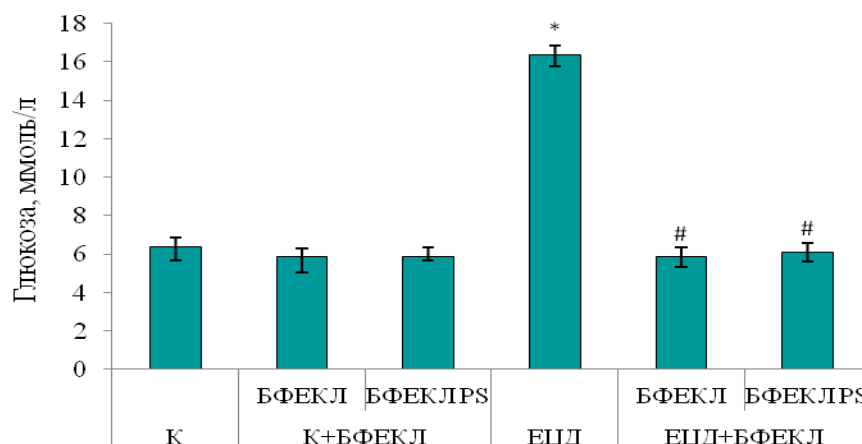


Рис. 3.18. Концентрація глюкози у крові щурів при введенні безалкалоїдної фракції екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД (нестабілізований екстракт позначено як БФЕКЛ, стабілізований – як БФЕКЛ PS). * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

У разі застосування безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* знижувався вміст HbA1c у тварин з досліджуваною патологією на 31 %, та у більшій мірі за використання стабілізованого за допомогою біосурфактанту PS-17 екстракту – на 41 %, порівняно з діабетом (рис. 3.19).

Таким чином, аналіз отриманих результатів вказує на те, що обидва досліджувані екстракти виявляють гіпоглікемічну дію лише за умов підвищеної концентрації глюкози, зокрема, при ЦД. Стабілізована за допомогою біосурфактанту PS-17 емульсія безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* ефективніше забезпечує компенсацію гіперглікемії за умов ЕЦД, порівняно з нестабілізованою вихідною сумішшю.

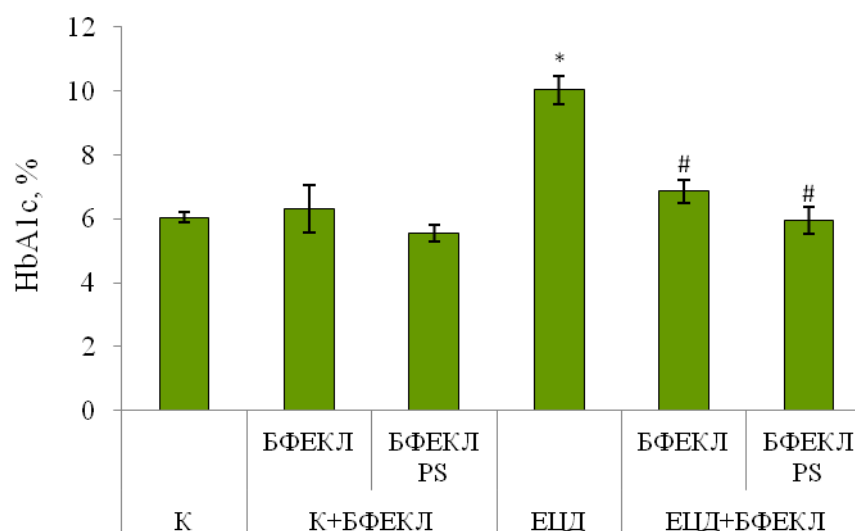


Рис. 3.19. Концентрація глікозильованого гемоглобіну у крові щурів при введенні безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (БФЕКЛ) та стабілізованої форми цього екстракту (БФЕКЛ PS) тваринам з ЕЦД. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Це може бути наслідком зростання розчинності та біодоступності біологічно активних речовин у складі досліджуваного фітопрепарату. З огляду на це, на наступних етапах роботи було досліджено біологічні ефекти стабілізованого екстракту *G. officinalis* (далі по тексті – на рисунках і у таблицях позначено як БФЕКЛ – безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського).

Антигіперглікемічну дію екстракту *G. officinalis* оцінювали за здатністю знижувати рівень глюкози на максимумі розвитку гіперглікемії після навантаження глюкозою. Для кількісного представлення сумарної відповіді на ГТТ, нами було обчислено площу під глікемічними кривими (Yeh, 2002).

На рис. 3.20-А наведено глікемічні криві здорових та хворих на діабет тварин, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* упродовж 14 днів. Максимальне підвищення концентрації глюкози у крові тварин контрольної групи (на 282 % щодо початкового рівня) зафіксовано на 20-ту хвилину після введення глюкози *per os* у дозі 1 г/кг маси тіла. У тварин з ЕЦД максимальне

підвищення концентрації глюкози в крові (на 51 % щодо вихідного рівня) зафіксовано на 20-ту хв після навантаження.

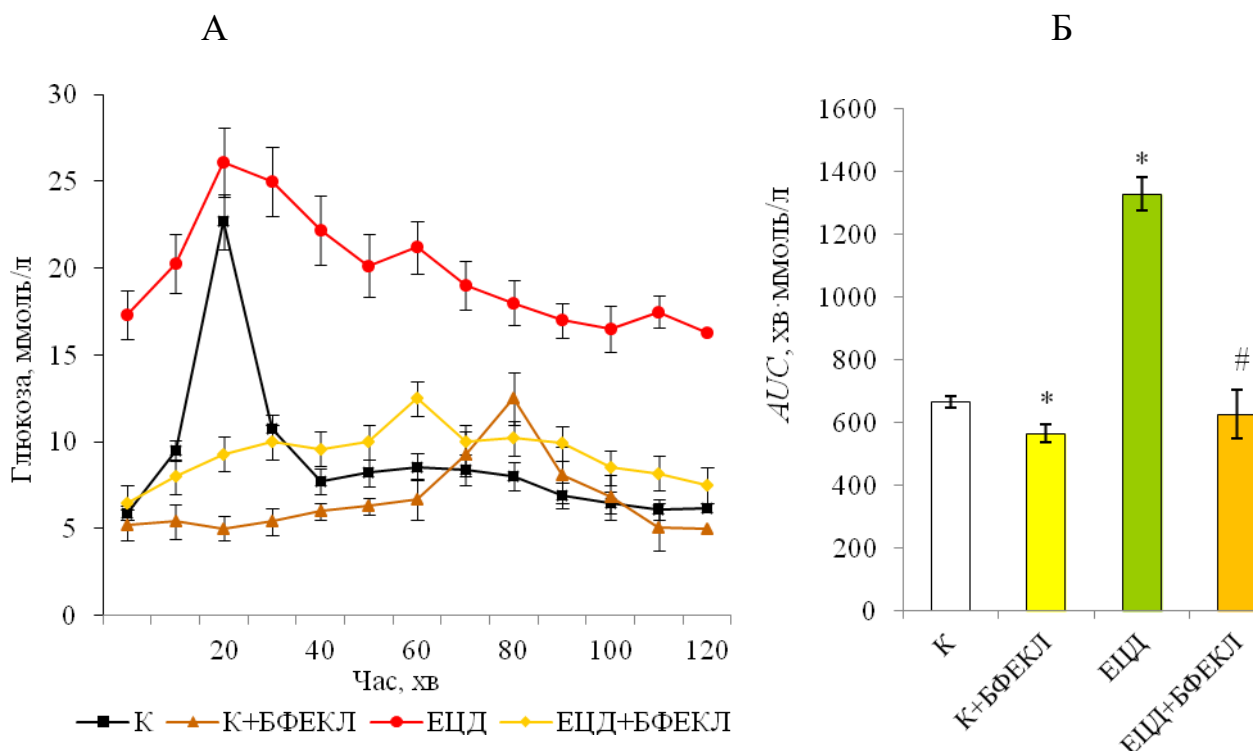


Рис. 3.20. Глікемічні криві здорових тварин та тварин з ЕЦД при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* стабілізованого біосурфактантом PS-17 (А); Площа під глікемічними кривими за досліджуваних умов (Б). * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Примітка: безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* стабілізований біосурфактантом PS-17 тут і далі на рис. позначено як БФЕКЛ (безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського)

Утилізація глюкози у тварин з ЦД відбувається повільніше, ніж у контрольних тварин. Збереження високого рівня глікемії в постабсорбтивному періоді свідчить про порушення толерантності до глюкози у тварин цієї групи. При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* контрольним тваринам відмічено зсув піку концентрації глюкози з 20-ї на 80-у хв проведення ПГТТ, і підвищення значень цього показника на 140 % щодо початкового рівня. Застосування безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* сприяло відновленню

толерантності до глюкози. Це зумовило зменшення інтегрального показника глікемії – площі під глікемічними кривими у контрольних та хворих на діабет тварин на 25 % і 47 % відповідно (див. рис. 3.20-Б).

Підсумки до розділу

Аналіз гіпоглікемічної дії водних екстрактів листя та кореневих бульб, а також стабілізованих і нестабілізованих суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* й безалкалоїдної фракції екстракту *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 *G. officinalis* є дуже цінною під час розробки антидіабетичних препаратів, які запобігатимуть гіперглікемії як етіологічній причині розвитку хронічних ускладнень ЦД.

Публікації:

1. 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.
2. Горбулінська О. В. Цукрознижувальна дія водних екстрактів якона (*Smalanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) / О. В. Горбулінська, М. Р. Хохла, Л. Т. Міщенко, **Г. Я. Гачкова**, Н. О. Сибірنا // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 57–64.
http://nbuv.gov.ua/UJRN/bist_2014_8_2_6.
3. Horbulinska A. V. Yacon's (*Smalanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) effects on postprandial glucose under experimental diabetes mellitus / A. V. Horbulinska, M. R. Khokhla, **Н. Я. Hachkova**, N. O. Sybirna // Ukr.

Biopharm. J. – 2016. – Vol. 3, № 44. – P. 63–69.
<https://doi.org/10.24959/ubphj.16.42>.

4. 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. – Випуск 73. – С. 421–428.
http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_73_115.

3.3. 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. Розвиток ЕЦД супроводжувався ураженням інкреторного апарату підшлункової залози. Відмічено нерівномірне розміщення острівців Лангерганса, а в окремих часточках повну їхню відсутність (рис. 3.21, Г). Морфометричний аналіз стану панкреатичних острівців показав, що їхня кількість на стандартній одиниці площі зменшилася у 3,6 рази порівняно з показниками контрольної групи. Також відмічено зміни індивідуальних параметрів острівців підшлункової залози: площі, діаметру, об'єму (табл. 3.3). У секреторних клітинах острівців Лангерганса виявлено дегенеративні процеси: вакуолізація цитоплазми, вогнища некрозу, нечіткість меж клітин (рис. 3.21, Г). Кількість β -клітин і їхніх секреторних гранул різко знижувалася, про що свідчить слабка інтенсивність забарвлення альдегід-фуксином.

В результаті гістологічного дослідження підшлункової залози тварин контрольної групи і тварин, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* (у дозах 600 та 1200 мг/кг) відмічено збереження правильної структури

часточок підшлункової залози. Острівці Лангерганса здебільшого середніх та крупних розмірів, добре виражені, оточені тонким прошарком сполучної тканини (рис. 3.21, А-В). При профарбовуванні альдегід-фуксином інсулінопродукуючі β -клітини, що складають основну клітинну популяцію, зосереджені переважно в центральній частині острівця. Ознак запалення і деструкції не виявлено.

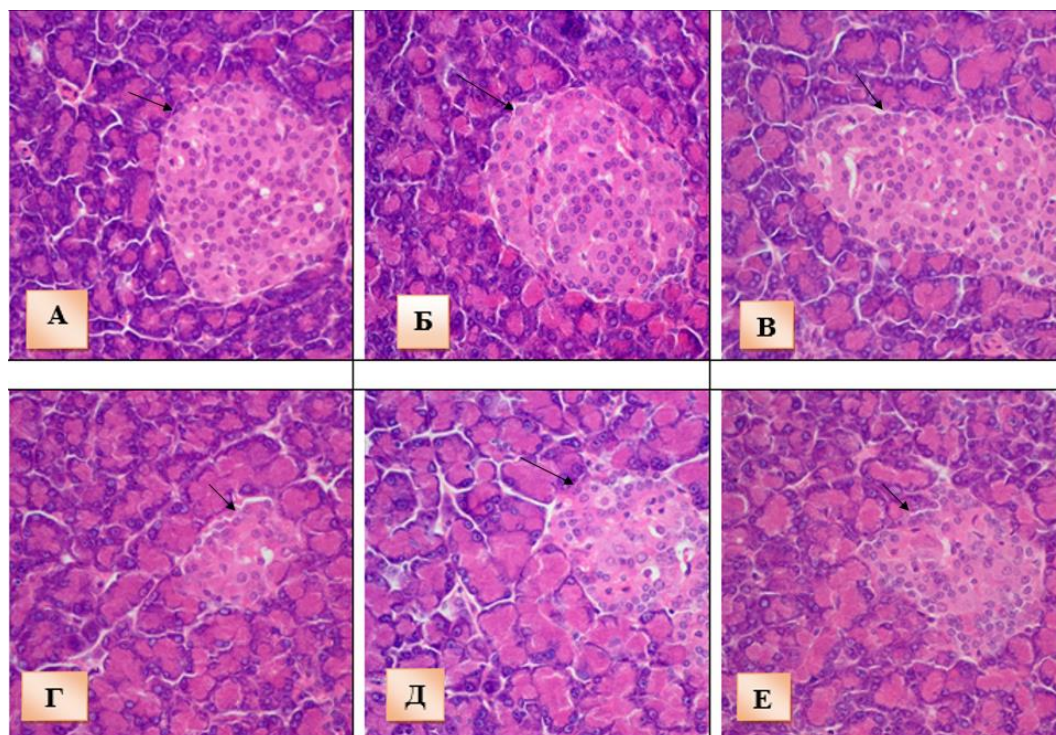


Рис. 3. Морфологічна структура ендокринної частини підшлункової залози. Стрілками показано острівці Лангерганса. (А – контроль (К), Б – К+БФЕКЛ (600 мг/кг), В – К+БФЕКЛ (1200 мг/кг) – велика кількість клітин у панкреатичних острівцях; Г – експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) – дрібний острівець Лангерганса з ознаками дисконлексації секреторних клітин з вакуолізацією цитоплазми; Д – ЕЦД+БФЕКЛ (600 мг/кг)– дистрофічні зміни острівця Лангерганса; Е – ЕЦД+БФЕКЛ (1200 мг/кг) – збільшення кількості секреторних клітин, зниження ступеня дистрофії). Фарбування гематоксилін – еозином. Збільшення 40x10.

При введенні тваринам з ЕЦД безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 0,6 г/кг маси тіла виявлено незначне збільшення кількості острівців Лангерганса на стандартній площі зрізу, їхньої середньої площі, діаметру, об'єму та кількості β-клітин порівняно з діабетом. Морфологічні зміни в цілому були ідентичні, як і в групі тварин з діабетом. Ознаки виражених дистрофічних змін зберігалися. Інтенсивність забарвлення альдегід-фуксином була знижена (рис. 3.21, Г; табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Морфометричний аналіз інкреторного апарату щурів при ЕЦД та на фоні введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Параметри	К	К+БФЕКЛ (600 мг/кг)	К+ БФЕКЛ (1200 мг/кг)	ЕЦД	ЕЦД+ БФЕКЛ (600 мг/кг)	ЕЦД+ БФЕКЛ (1200 мг/кг)
Кількість острівців на площі зрізу, N/10мм ²	15,9±0,9	14,9±0,9	15,7±0,6	4,4±0,8*	5,7±0,6*	6,6±0,6**
Площа острівців, мкм ²	10440± 358,5	9785± 523,7	10900± 388,2	4620± 497,0*	5354± 387,4*	6623± 331,2**
Діаметр Острівців, мкм	160,7±3,8	152,6±5,7	161,9±5,6	106,5±4,7*	113,7±3,8*	119,7±4,7*
Об'єм острівців, мкм ³	2,2x10 ⁶ ± 1,5x10 ⁵	1,9x10 ⁶ ± 2,3x10 ⁵	2,3x10 ⁶ ± 2,4x10 ⁵	6,6x10 ⁵ ± 8,9x10 ⁴ *	7,9x10 ⁵ ± 7,4x10 ⁴ *	9,3x10 ⁵ ± 11,4x10 ⁴ *
Кількість β-клітин /1000мкм ²	7,8±0,3	7,2±0,2	8,1±0,4	4,7±0,2*	5,1±0,3*	5,6±0,1**

* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05

Натомість, при введенні екстракту у дозі 1,2 г/кг маси тіла встановлено покращення гістологічної структури островців підшлункової залози, про що свідчить статистично 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 %), а також кількості β -клітин (на 39 %), порівняно з показниками у тварин з ЕЦД. Виявлено відносно збережені β -клітини з ознаками незначної вакуолізації цитоплазми і зниженням ступеня де грануляції (рис. 3.21, Е; табл. 3.3). Ці результати підтверджують цитопротекторну дію досліджуваного екстракту на інкреторний апарат підшлункової залози.

Протекторний вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на островцевий апарат підшлункової залози у разі діабету підтверджують дослідження вмісту інсуліну та С-пептиду – показників, які характеризують функціональний стан бета-клітин. Після курсу введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у дозі 0,6 г/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. 3.22 А, Б).

Зважаючи на те, що гомеостаз глюкози за ЦД може порушуватися не лише при втраті клітинами інсулінопродукуючої функції, розвитку дисфункції β -клітин, але й при підвищенні вмісту прозапальних цитокінів у крові (Greenberg & McDaniel, 2002) було проведено дослідження вмісту TNF- α у піддослідних тварин. На тлі порушення структурно-функціональної організації островців Лангерганса за умов ЦД відмічено підвищення вмісту TNF- α у підшлунковій залозі. У тварин контрольної групи та хворих на діабет, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, встановлено зниження вмісту TNF- α у підшлунковій залозі на 40 та 37 % відповідно (рис. 3.22, В).

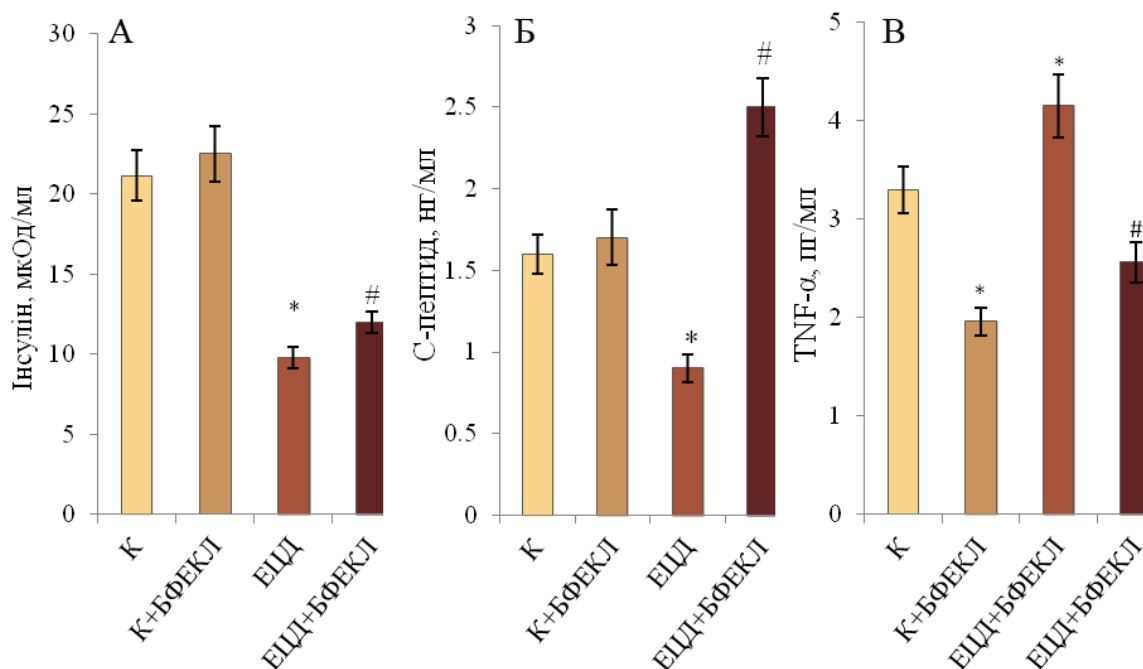


Рис. 3.22. Концентрація інсуліну (А), С-пептиду (Б) та TNF-α (В) у плазмі крові тварин у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення БФЕКЛ. *– різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Підсумок до розділу

Аналіз отриманих результатів підтверджує виражену антидіабетичну дію безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, зокрема, зниження рівня глікемії натще, концентрації глікозильованого гемоглобіну, відновлення толерантності до глюкози, підвищення рівня інсуліну, а також цитопротекторний вплив на інкреторний апарат підшлункової залози. З огляду на те, що введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам контрольної групи істотно не впливало на досліджувані показники, можемо робити висновок, що безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* виявляє гіпоглікемічні властивості лише за умов гіперглікемії.

Публікації:

1. Горбулінська О. Цукрознижувальна дія водних екстрактів якона (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) / О. Горбулінська, М. Хохла,

Л. Міщенко, Г. Гачкова, Н. Сибірна // Біологічні студії. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 57–64. http://nbuv.gov.ua/UJRN/bist_2014_8_2_6.

2. **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. DOI: 10.3390/antiox10091362.

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

Оксидативно-нітративний стрес, індукований гіперглікемією, розглядають як головний механізм пошкодження β -клітин, який прискорює прогресування ЦД та виникнення його ускладнень (Drel, 2010; Evans et al., 2005; Yaribeygi et al., 2020). Відтак, актуальним є створення антидіабетичних препаратів та функціональних харчових продуктів, які ефективно запобігатимуть не лише гіперглікемії, а й розвитку оксидативного стресу.

Попередній скринінг антиоксидантної активності (АОА) потенційних фітопрепаратів передбачає використання методів первинної оцінки антиоксидантних властивостей БАР, що входять до їхнього складу в експериментах *in vitro*. Комплексне застосування різних систем для тестування *in vitro* антиоксидантної активності дає змогу оцінити антиоксидантні властивості сполук з різними фізико-хімічними властивостями.

Порівняльний аналіз АОА екстракту листя *S. sonchifolius* та безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* показав, що екстракт листя *S. sonchifolius* у 3,4 рази ефективніше інгібує DPPH $\cdot$, у 3,7 рази – ABTS $\cdot^+$ та виявляє вищу в 1,6 рази залізовідновлювальну здатність, порівняно з екстрактом *G. officinalis*. Вища антиоксидантна активність та залізохелатуюча здатність екстракту *S. sonchifolius* зумовлена вищим вмістом у його складі

сполук фенольної природи, що в 1,7 рази перевищує вміст фенольних сполук в екстракті *G. officinalis* (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

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

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

Примітка: TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity)

Результати дослідження АОА екстрактів *G. officinalis* та *S. sonchifolius in vitro* було підтверджено в експериментах *in vivo* при дослідженні оксидативно-нітративного стресу у клітинах крові та підшлункової залози.

Розвиток ЕЦД супроводжувався значним підвищенням рівня АФО у лейкоцитах щурів, що у 3,7 разів перевищує контрольні значення (рис. 3.23, А-Б). Головними ензиматичними системами, які утворюють АФО у лейкоцитах є мембранозв'язана НАДФН-оксидаза, мієлопероксидаза нейтрофілів, еозинофільна пероксидаза еозинофілів, а також NO-синтаза (Nguyen & Varela, 2017; Soomro, 2019). У разі введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* виявлено зниження рівня АФО у лейкоцитах контрольних тварин (на 29,8 % порівняно з контролем) та за умов ЕЦД (у 2,5 рази порівняно з діабетом) (рис. 3.23, А-Б).

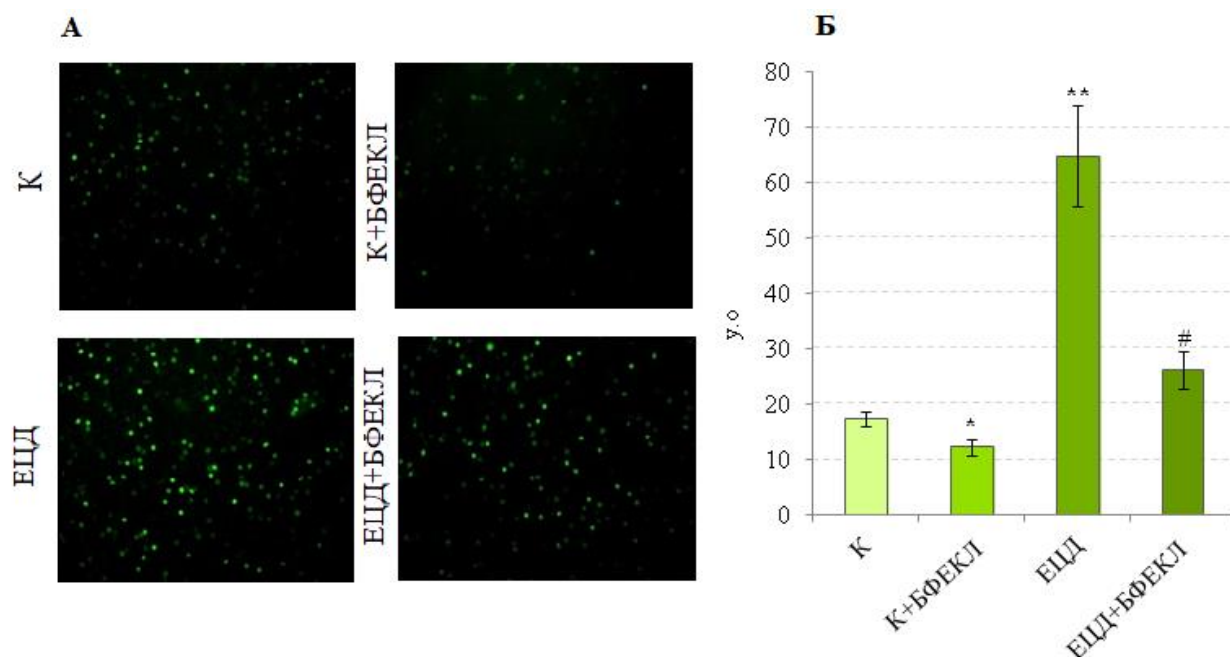


Рис. 3.23. А – Мікрофотографії лейкоцитів периферичної крові щурів (x40); Б – Оцифровані дані мікрофотографій, що відображають вміст АФО у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флюоресценції 2',7'- H2DCFDA. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Як видно з табл. 3.5, у лейкоцитах щурів за досліджуваної патології підвищується активність NO-синтази (в 1,6 рази), зростає вміст стабільних окиснених форм NO – нітрит- та нітрат-аніонів у 1,6 та 3,8 рази, відповідно. Підвищення вмісту супероксид-аніон радикалу за умов хронічної гіперглікемії, а також здатність його при взаємодії з NO утворювати цитотоксичний пероксинітрит (ONOO^-), зумовлює множинні патологічні зміни у функціонуванні метаболічних та сигнальних шляхів, порушення гомеостазу клітин і органів при цукровому діабеті [Drel, 2010; Pacher et al., 2007)].

За умов введення БФЕКЛ тваринам зі стрептозотоцин-індукованим діабетом відмічено незначне зниження активності NO-синтази (в 1,3 рази) та вмісту нітрат-аніонів (в 1,4 рази), порівняно з діабетом (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Активність NO-синтази, вміст нітрит- та нітрат-аніонів в лейкоцитах щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*

Умови експерименту	Вміст NO_2^- , нмоль/мг протеїну	Вміст NO_3^- , нмоль/мг протеїну	Активність NO-синтази, нмоль NO_2^- /хв·мг протеїну
К	0,45±0,043	17,76±3,75	6,99±1,09
К+БФЕКЛ	0,47±0,035	24,66±3,56	8,84±0,31
ЕЦД	0,72±0,02*	67,94±5,5*	11,21±0,8*
ЕЦД + БФЕКЛ	0,54±0,059	49,07±5,83 [#]	8,45±0,48 [#]

* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Таким чином, БФЕКЛ проявляє інгібуючу дію на активність NO-синтази знижуючи надпродукцію NO та пригнічує утворення АФО в лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД. Отримані результати підтверджують антиоксидантну дію досліджуваного екстракту.

Внаслідок зростання вмісту АФО та АФН за умов діабету у клітинах крові посилюються процеси вільнорадикального окиснення біосубстратів – протеїнів та ліпідів (табл. 3.6). Вміст продуктів окисної модифікації протеїнів (ОМП) нейтрального та основного характеру підвищувався у лейкоцитах (2,3 та 3,4 рази, відповідно) та у плазмі крові (у 2,6 та 2,9 рази, відповідно). Також, встановлено зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах у 2,6 рази (табл. 3.6), гемолізатах та плазмі крові у 1,8 рази (табл. 3.7), порівняно з контролем. Внаслідок посилення процесів ПОЛ змінюються фізико-хімічні характеристики мембран клітин крові, що відображається на реологічних властивостях (Y. Wang et al., 2021; Zarkovic et al., 2013).

Процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і протеїнів, а також неензиматичне глікозилювання слугують джерелом активних карбонільних

сполук (АКС) в організмі. АКС є подібними до АФО за біологічними ефектами, однак мають триваліший час існування. Відтак, є не менш небезпечними, ніж АФО. АКС діють, як високореакційноздатні електрофільні молекули, які легко модифікують протеїни, нуклеїнові кислоти, фосфоліпіди, зумовлюючи цитотоксичні та мутагенні ефекти (Ramplona R., 2011). Також АКС можуть активувати каскад сигнальних молекул і факторів транскрипції (Zarkovic et al., 2013).

Таблиця 3.6

Вміст продуктів окисної модифікації ліпідів та протеїнів у лейкоцитах за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*

Умови експерименту	ТБК-ПП, мкмоль/мг протеїну	ОМБ, у.о./г протеїну E ₃₇₀	ОМБ, у.о./г протеїну E ₄₃₀
Контроль	0,83±0,14	38,10±0,31	21,34±2,31
К+БФЕКЛ	0,79±0,11	28,80±2,51	19,64±3,22
ЕЦД	2,16±0,28*	87,63±9,20*	72,56±9,71*
ЕЦД+БФЕКЛ	2,05±0,19*	59,68±8,91*#	39,74±4,23*#

*— різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P < 0,05

Доведено здатність безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* пригнічувати процеси окисної модифікації протеїнів та ліпідів за умов ЕЦД. Вміст продуктів ОМБ нейтрального характеру знижувався у лейкоцитах і плазмі крові на 31,9 % і 65,7 %, основного характеру – на 48,4 % і 69,0 % з наближенням їхнього вмісту до рівня фізіологічних значень (табл. 3.7). У групі здорових тварин антиоксидантна дія досліджуваного екстракту виражена у меншій мірі, ніж за умов ЕЦД. Ітенсивність накопичення продуктів ПОЛ знижувалася у лейкоцитах тварин контрольної групи та хворих на ЦД, проте вплив досліджуваного екстракту на ці процеси є менше виражений, ніж на ОМП (табл. 3.6-3.7).

Таблиця 3.7

Вміст продуктів окисної модифікації ліпідів та протеїнів у гемолізатах та плазмі крові за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту

G.officinalis

Умови експерименту	ТБК-ПП, мкмоль/мг протеїну		ОМБ, у.о./г протеїну (плазма)	
	гемолізати	плазма	нейтрального характеру E_{370}	основного характеру E_{430}
Контроль	1,03±0,11	2,54±0,18	11,63±0,11	6,54±0,31
К+БФЕКЛ	1,58±0,16	3,23±0,33	9,80±0,51	5,84±0,22
ЕЦД	1,82±0,18 *	4,67±0,43 *	30,75±1,20 *	19,21±0,70 *
ЕЦД+БФЕКЛ	1,18±0,10 [#]	3,25±0,21 ^{*#}	10,54±0,91 ^{*#}	5,95±0,23 [#]

* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Аналіз отриманих результатів свідчить про неспроможність АОС клітин крові реалізувати в повному обсязі захисно-адаптаційні механізми за умов окисдатовно-нітративного стресу. Активність СОД, каталази та ГПО знижувалася у лейкоцитах та еритроцитах щурів при стрептозотоцин-індукованому діабеті (табл. 3.8). Причиною інактивації ензимів за даної патології може бути їхнє глікозилювання або ушкодження активованими кисневими метаболітами.

У разі введення безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* тваринам контрольної групи в лейкоцитах підвищувалася активність каталази (на 19,5 %) та ГПО (на 32,5 %), натомість в еритроцитах збільшувалася лише активність СОД (на 33,7 %). У тварин з ЕЦД після введення екстракту встановлено вірогідне зростання активності СОД (на 47,1 %) і каталази (на 23,4 %) в лейкоцитах та ГПО (на 25,5 %) – в еритроцитах (табл. 3.8).

Активність ензимів АОС у клітинах крові за умов ЕЦД та при введенні
безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*

Тип клітин	Умови експерименту			
	К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
<i>Активність СОД, U/мг протеїну</i>				
Лейкоцити	266,0±23,5	266,5±14,6	206,5±24,8*	390,1±26,7 [#]
Еритроцити	15,1±0,6	20,2±1,4*	6,5±0,5*	8,1±0,7
<i>Активність каталази, нмоль H₂O₂/хв×мг протеїну</i>				
Лейкоцити	3,46±0,2	4,3±0,2*	2,75±0,2*	3,59±0,2 [#]
Еритроцити	5,18±0,50	3,78±0,37	3,06±0,30 *	4,03±0,25
<i>Активність ГПО, мкмоль G-SH/хв×мг протеїну</i>				
Лейкоцити	49,9±1,0	66,1±1,8*	30,5±1,7*	36,1±2,6
Еритроцити	15,6±1,4	17,4±1,3	10,8±0,3*	14,5±1,2 [#]

*— різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # — різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P < 0,05

β-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози є надзвичайно чутливими до оксидативно-нітративного стресу з огляду на високий рівень АФО та низьку антиоксидантну здатність цих клітин (Eguchi et al., 2021). У АФО Окиснення фосфоліпідів мембран мітохондрій β-клітин підшлункової залози, призводить до витоку протонів із ланцюга транспорту електронів та зменшення утворення АТФ, який є критичним параметром у процесі синтезу інсуліну (Matsuzaki et al., 2021; Zhongmin M., 2012)]. Дисфункція β-клітин та порушення вироблення інсуліну є ключовими чинниками в патогенезі ЦД 1 типу.

За умов ЕЦД встановлено підвищення активності індукцйбельної NO-синтази та вмісту продуктів ПОЛ у підшлунковій залозі в 1,5 рази, натомість вміст карбонільних груп протеїнів вірогідно не змінювався (рис. 3.24-3.25).

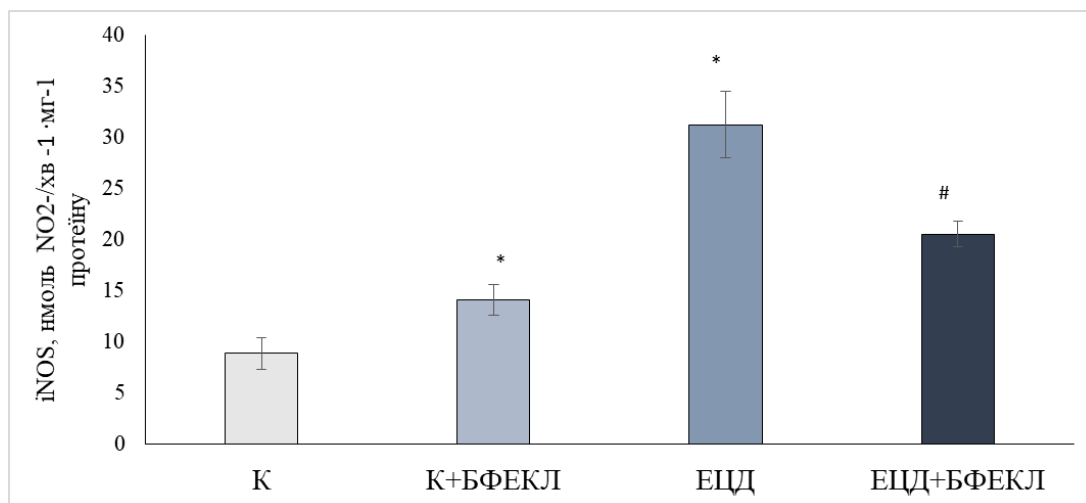


Рис. 3.24. Активність індукцйбельної NO-синтази у підшлунковій залозі за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*. *– різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Показано зниження активності NO-синтази у діабетичних тварин та вмісту ТБК-позитивних продуктів у здорових та хворих на ЦД тварин при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* (рис. 3.25-3.26).

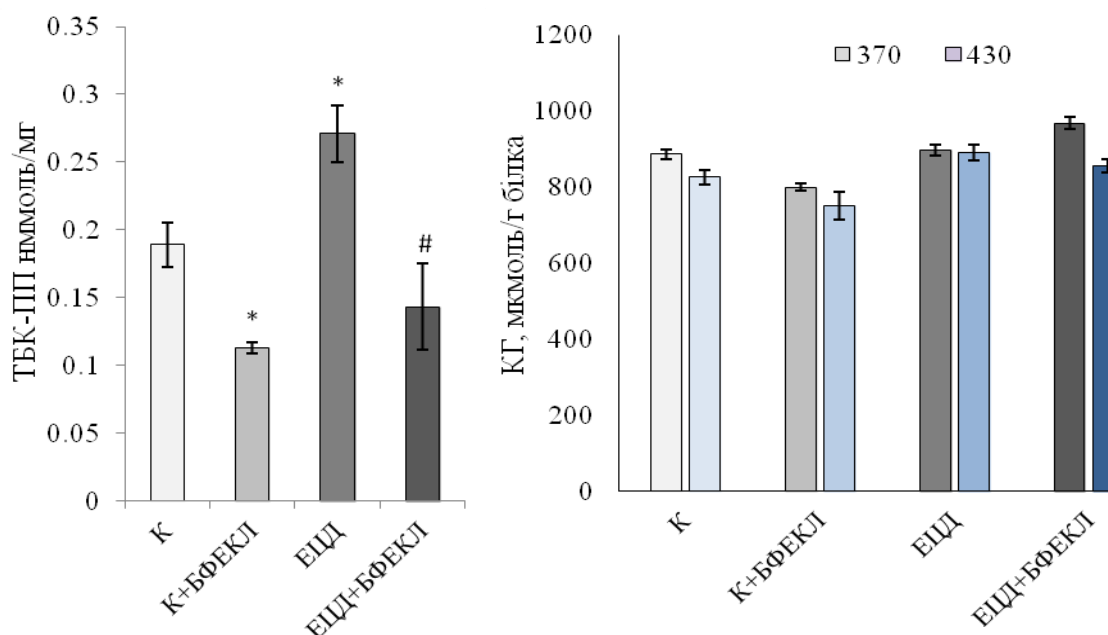


Рис. 3.25. Вміст продуктів окисної модифікації ліпідів та протеїнів у підшлунковій залозі за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*. *– різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

За умов ЕЦД встановлено незначне підвищення активності СОД у підшлунковій залозі, при цьому активність каталази вірогідно не змінювалася (рис. 3.26). Літературні дані підтверджують захисний вплив СОД від інактивації супероксид-аніон радикалом каталази. Водночас, каталаза, запобігає окисненню гідроген перосидом активного центру СОД (Costa et al., 2002; Goldstone et al., 2006; Gottfredsen et al., 2013).

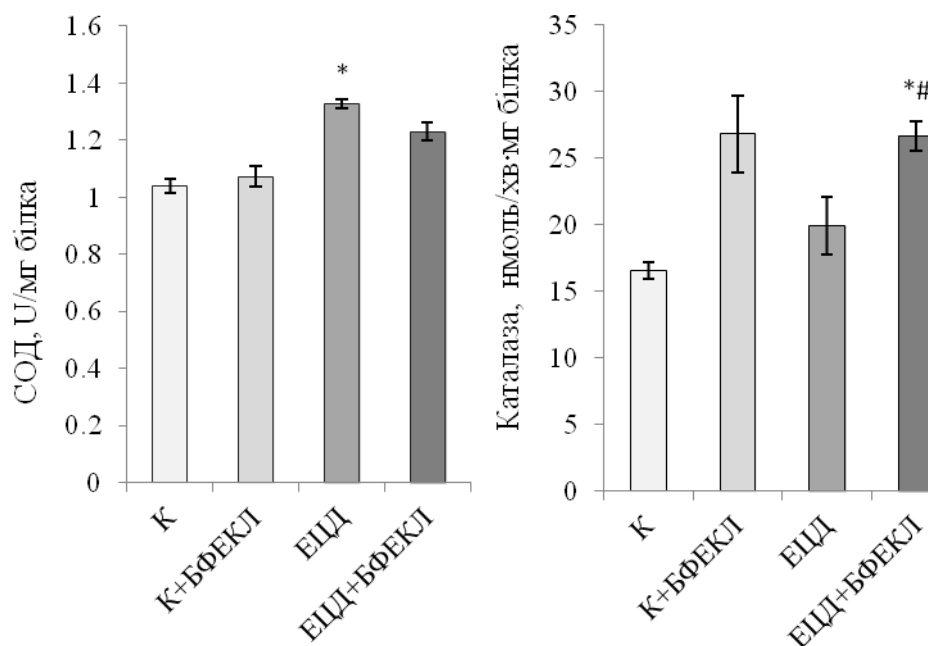


Рис. 3.26. Активність СОД і каталази у підшлунковій залозі за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

За умов ЕЦД встановлено зниження в 1,2 рази активності ГПО (рис. 3.27) та вмісту відновленого глутатіону. Введення БФЕКЛ призводило до підвищення активності каталази, ГПО та вмісту відновленого глутатіону у підшлунковій залозі діабетичних тварин.

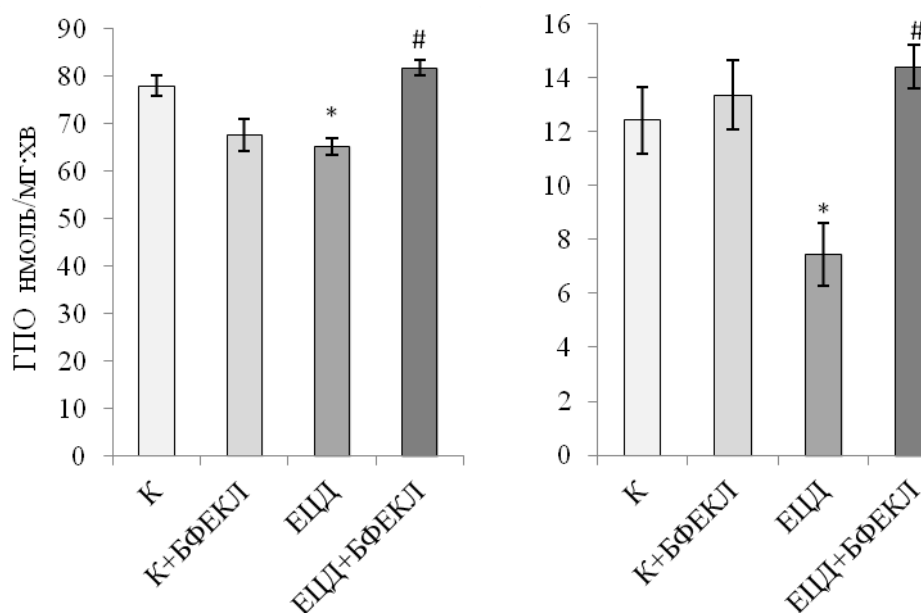


Рис. 3.27. Активність ГПО та вміст відновленого глутатіону у підшлунковій залозі за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G.officinalis*. * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Таким чином, безалкалоїдний екстракт *G.officinalis* у дозі 600 мг/кг здійснює коригуючий вплив на ключові ензими АОС клітин крові та підшлункової залози щурів за ЕЦД. Підвищення активності ензимів АОС у разі введення безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* тваринам з ЕЦД узгоджується з результатами пригнічуючої дії цього екстракту на процеси утворення АФО, окислювальної модифікації протеїнів і ліпідів. Антиоксидантний ефект безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* за умов ЕЦД ми пояснюємо здатністю БАР екстракту (фітол, флавоноїди, фенольні кислоти та вітамін Е) регулювати прооксидантно-антиоксидантну рівновагу шляхом скавенджерування вільних радикалів та запобігання інгібування ключових компонентів ензиматичної ланки АОС.

S. sonchifolius – це багате джерело різноманітних біологічно активних речовин і фенольних сполук, зокрема (Simonovska et al., 2003). Метаболіти фенольної природи є однією з найважливіших груп природних антиоксидантів.

Тому цю рослину можна розглядати як цінну сировину для отримання антиоксидантів природного походження. Згідно з літературними даними, сполуки фенольної природи зосереджені основним чином у листі *S. sonchifolius* (Lachman et al., 2003a; Valentova et al., 2016).

При введенні водних екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* відмічено зниження ТБК – позитивних продуктів у гемолізатах контрольних тварин відповідно на: 47 % (К+Ел⁵⁰⁰), 38 % (К+Ек⁵⁰⁰), 55 % (К+Ск), 39 % (К+Ск^{Ps}) та у тварин з ЕЦД на: 79 % (ЕЦД +Ел⁵⁰⁰), 37 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰), 71% (ЕЦД+Ск), 74 % (ЕЦД+Ск^{Ps}) (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Вміст ТБК-позитивних продуктів (ТБК-ПП) у лізатах еритроцитів та лейкоцитів при введенні водних екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД

Умови експерименту	ТБК-ПП, мкмоль/мг білка	
	еритроцити	лейкоцити
<i>К</i>	<i>1,03±0,11</i>	<i>3,03±0,48</i>
К+Ел ⁵⁰⁰	0,55±0,07*	2,90±0,32
К+Ек ⁵⁰⁰	0,64±0,11*	3,30±0,28
К+Ск	0,46±0,07*	3,25±0,63
К+Ск ^{Ps}	0,63±0,005*	3,46±0,59
<i>ЕЦД</i>	<i>1,82±0,18*</i>	<i>4,42±0,21*</i>
ЕЦД +Ел ⁵⁰⁰	0,38±0,03*#	3,91±0,33*
ЕЦД+Ек ⁵⁰⁰	1,15±0,01#	2,98±0,43#
ЕЦД+Ск	0,53±0,02*#	2,57±0,23#
ЕЦД+Ск ^{Ps}	0,47±0,03*#	2,92±0,67#

*– різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Введення водних екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* щурам з ЕЦД зумовлювало мобілізацію ензимів АОС еритроцитів: активність СОД підвищувалася на 169 % (ЕЦД+Ел⁵⁰⁰), на 97 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰), на 213 % (ЕЦД+Ск), 136 % (ЕЦД+Ск^{Ps}); активність каталази – на 26% (ЕЦД+Ел⁵⁰⁰), на 94 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰), на 60 % (ЕЦД+Ск^{Ps}); активність ГПО – на 67 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰) і на 57 % (ЕЦД+Ск^{Ps}). При цьому, у відповідь на введення тваринам з ЕЦД досліджуваних екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* активність СОД, каталази та ГПО зростала. Лише у разі застосування стабілізованої суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* відмічено нормалізацію активності цих ензимів (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Активність окремих ензимів АОС в еритроцитах при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД

Умови експерименту	Активність СОД, U/мг білка	Активність каталази, нмоль H ₂ O ₂ / хв× мг білка	Активність ГПО, мкмоль G-SH/хв× мг білка
К	15,10±0,60	5,18±0,30	15,62±1,48
К+Ел ⁵⁰⁰	20,33±1,47*	4,18±0,24	12,30±1,30*
К+Ек ⁵⁰⁰	16,00±1,12	4,38±0,33	17,30±0,99
К+Ск	14,10±1,25	4,10±0,29	16,78±1,24
К+Ск ^{Ps}	12,30±0,54	4,34±0,22	16,30±0,89
ЕЦД	6,50±0,50*	3,06±0,30*	10,84±0,31*
ЕЦД +Ел ⁵⁰⁰	17,50±0,21* [#]	3,86±0,33* [#]	8,18±0,99*
ЕЦД+Ек ⁵⁰⁰	12,80±0,89* [#]	5,95±0,40 [#]	18,10±0,75 [#]
ЕЦД+Ск	20,33±1,47* [#]	3,27±0,31*	12,01±0,37* [#]
ЕЦД+Ск ^{Ps}	15,31±0,39 [#]	4,89±0,16 [#]	16,95±0,25 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05

Застосування екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* за умов ЕЦД призводило до підвищення активності СОД у лейкоцитах відповідно на: 10,4 % (ЕЦД +Ел⁵⁰⁰) та 12,5 % (ЕЦД+Ск^{Ps}). Також нами відмічено зростання активності каталази – на 10,8 % (ЕЦД +Ел⁵⁰⁰), 25,6 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰), 16,2 % (ЕЦД+Ск), 24,1 % (ЕЦД+Ск^{Ps}) та ГПО – на 22,1 % (ЕЦД +Ел⁵⁰⁰), 53,4 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰), 24,2 % (ЕЦД+Ск), 34,5 % (ЕЦД+Ск^{Ps}) (табл. 3.11). Введення досліджуваних екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* контрольним тваринам не впливало на активність СОД та ГПО, натомість активність каталази знижувалася на 11,3 % (К+Ел⁵⁰⁰), 19,5 % (К+Ек⁵⁰⁰), 9,2 % (К+Ск) та 19,7 % (К+Ск^{Ps}) (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Активність окремих ензимів АОС у лейкоцитах при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД

Умови експерименту	Активність СОД, У/мг протеїну	Активність каталази, нмоль Н ₂ О ₂ / хв×мг протеїну	Активність ГПО, мкмоль G-SH/хв×мг протеїну
К	225,09±15,44	6,09±0,48	40,10±,6,8
К+Ел ⁵⁰⁰	221,65±27,78	5,40±0,35	40,15±,2,4
К+Ек ⁵⁰⁰	227,81±28,35	4,90±0,48*	40,6±4,7
К+Ск	223,43±24,59	5,53±0,22	39,4±3,9
К+Ск ^{Ps}	226,61±22,40	4,89±0,68*	43,0±4,9
ЕЦД	194,09±17,61*	3,9±0,39*	28,1±4,5*
ЕЦД+Ел ⁵⁰⁰	214,23±12,34 [#]	4,32±0,01*	34,3±1,8
ЕЦД+Ек ⁵⁰⁰	201,94±8,54*	4,90±0,46 [#]	43,1±7,9 [#]
ЕЦД+Ск	201,35±12,22*	4,53±0,30*	34,9±2,3
ЕЦД+Ск ^{Ps}	218,33±19,59 [#]	4,84±0,42 [#]	37,8±4,8 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05

При цьому слід зазначити, що у лейкоцитах, як і в еритроцитах тварин з ЕЦД, нормалізація активності ензимів АОС досягається у разі застосування стабілізованої суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* (табл. 3.10-3.11).

Антиоксидантні властивості водного екстракту листя *S. sonchifolius* можуть бути зумовлені наявністю у його складі фенольних сполук, серед яких каваова кислота та її похідні (2,3,5-трикавоілхінна кислота, 3, 5 – дикавоілхінна кислота, 1,5-ді-О-кавоілхінна кислота), хлорогенова, протокатехова та ферулова кислоти, всі вони володіють потужною антиоксидантною активністю та відомі своєю здатністю вловлювати вільні радикали (Honore & Genta, 2015; Lachman et al., 2003a; Russo et al., 2015; Valentová et al., 2005; Valentova et al., 2016). Також, встановлено що листя *S. sonchifolius* містить низку флавоноїдів, а саме – 5,7-дигідрокси-4'-метоксиізофлавонол; 5,7,3'-тригідрокси-4'-метоксиізофлавонол; 5-гідрокси-4'-метокси-7-О-глікозил флавонол і 7,4'-дигідрокси-3,5'-діметоксіфлавонол, які виявляють антиоксидантну активність подібно до рутину, кверцетину та вітаміну С (Aguilar F. & Bonilla R., 2009).

У складі кореневих бульб *S. sonchifolius*, як і в листі є низка сполук фенольної природи, серед яких нові складні естери каваової кислоти: 2,4 або 3,5-дикавоілхінна кислота, 2,5-дикавоілхінна кислота, 2,3,5 або 2,4,5-трикавоілхінна кислота, хлорогенова та ферулова кислоти, які володіють вираженою антиоксидантною активністю (Lachman et al., 2003b, 2007).

Підсумок до розділу

Антиоксидантний потенціал екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* та безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* підтверджено за умов *in vitro* та *in vivo* на клітинах крові та підшлункової залози.

Встановлено антиоксидантний ефект водних екстрактів листя і кореневих бульб *S. sonchifolius* за умов ЕЦД, який відображають зміни молекулярних маркерів, що характеризують оксидативний стрес (ТБК-позитивні продукти, активність ключових ензимів АОС). Найвираженішу антиоксидантну дію

виявляли водний екстракт кореневих бульб *S. sonchifolius* у дозі 500 мг / кг та стабілізована біосурфактантом PS-17 суспензія кореневих бульб *S. sonchifolius*.

Безалкалоїдний екстракт *G.officinalis* виявляв помірну антиоксидантну активність та поступався екстракту *S. sonchifolius* за здатністю нейтралізувати АФО та зв'язувати іони металів змінної валентності в експериментах *in vitro*. Вираженість антиоксидантної активності досліджуваних екстрактів зумовлена відмінностями кількісного вмісту у їхньому складі сполук фенольної природи.

Отримані результати доводять цінність *S. sonchifolius* та безалкалоїдного екстракту *G.officinalis* як джерела біологічно активних речовин для профілактики хронічних захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом, серед яких ЦД.

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

3.5.1. Мембраностабілізуюча дія екстракту безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* за умов стрептозотоцин-індукованого діабету

Тривала гіперглікемія зумовлює зміни морфології, метаболізму і функцій еритроцитів, що неминуче впливає на гемореологію і *мікроциркуляцію* (M. Wang et al., 2012; Zhou et al., 2018).

Встановлено зниження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов стрептозотоцин-індукованого ЦД: знижувалася тривалість гемолізу і час гемолізу максимальної кількості еритроцитів, порівняно з контролем (табл. 3.12, рис. 3.29). Встановлено дуже швидке зростання основного піку на еритрограмі (на 2,1 хв) та швидкий гемоліз еритроцитів, який завершувався на 7,4 хв. У контрольних тварин пік гемолізу простежувався на

3,7 хв, тривалість гемолізу становила 9,75 хв. Типові кислотні еритрограми зміщені ліворуч щодо контролю внаслідок скорочення тривалості сферуляції.

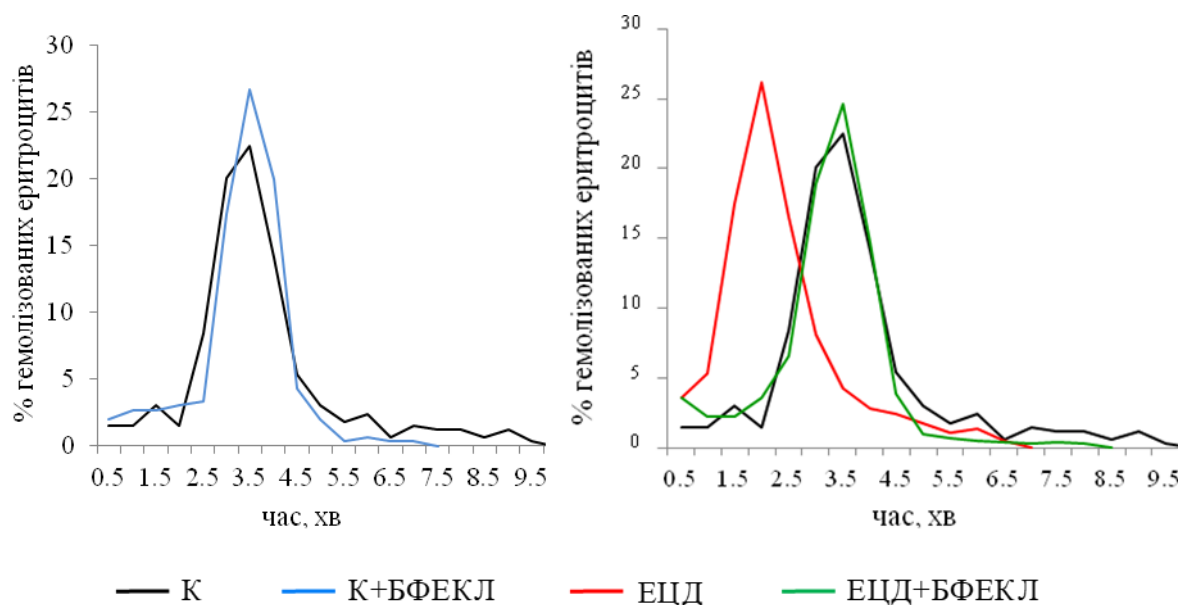


Рис. 3.29. Типові еритрограми за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Зниження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов досліджуваної патології свідчить про порушення структурної організації мембран та пришвидшене старіння еритроцитів. Найімовірніше встановлені зміни зумовлені надмірною активацією процесів ПОЛ, розвитком оксидативно-нітративного стресу, а також глікацією протеїнів мембран еритроцитів.

При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* у тварин з ЕЦД збільшувалася тривалість гемолізу еритроцитів (до 8,33 хв проти 7,4 за умов діабету), збільшувався час досягнення максимуму гемолізу (до 3,67 хв проти 2,1 хв) (див. табл. 3.12). Отже, за введення безалкалоїдного екстракту підвищується стійкість мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика, що на нашу думку опосередковано гіпоглікемічною дією БАР у складі цього екстракту.

Таблиця 3.12

Показники резистентності еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Умови експерименту	Тривалість гемолізу, хв	Час гемолізу максимальної кількості еритроцитів, хв	Мах частка гемолізованих еритроцитів, %
Контроль	9,75±0,99	3,70±0,13	22,56±1,65
К+БЕКЛ	7,83±0,60	3,50±0,01	25,41±3,58
ЕЦД	7,40±0,37*	2,10±0,19*	26,29±3,00
ЕЦД+БЕКЛ	8,33±0,60 [#]	3,67±0,17 [#]	24,87±2,30

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P<0,05$

Для оцінки напруженості еритропоезу підраховували кількість ретикулоцитів і їхню добову продукцію. Встановлено зростання кількості та добової продукції ретикулоцитів відповідно у 2,4 та 2,1 рази при ЕЦД (табл. 3.13). Стимуляція еритропоезу у кістковому мозку є компенсаторною реакцією, що забезпечує збільшення кисневої ємності крові (Y. Wang et al., 2021).

Таблиця 3.13

Кількість та добова продукція ретикулоцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Умови експерименту	Кількість ретикулоцитів, ‰	Добова продукція ретикулоцитів, $\cdot 10^6$
Контроль	3,45±0,32	48,77±4,01
К+БФЕКЛ	4,12±0,11	52,11±3,45
ЕЦД	8,27±0,63*	102,55±1,42*
ЕЦД+БФЕКЛ	6,23±0,25 ^{*#}	75,55±2,34 ^{*#}

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P<0,05$

Проте збільшення кількості ретикулоцитів на фоні зниження стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу (див. рис. 3.29) свідчить про вихід у кровотік клітин зі зниженою резистентністю. Введення позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis* супроводжувалося зменшенням кількості та добової продукції ретикулоцитів на 24,7 та 26,3 %, відповідно (табл. 3.13).

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* пов'язаний зі змінами відсоткового співвідношення різних вікових популяцій еритроцитів за умов ЕЦД. При фракціонуванні еритроцитів у градієнті густини сахарози еритроцити було розділені на три популяції: 1-ша популяція (П1) – „фізіологічно старі” (низькостійкі) – містила 0-5 ‰ ретикулоцитів; 2-га популяція (П2) – „фізіологічно зрілі” (середньостійкі) – 13-16 ‰; 3-я популяція (П3) – „фізіологічно юні” (високостійкі) – 20-23 ‰ ретикулоцитів. За умов ЦД спостерігається перерозподіл популяційного складу клітин (табл. 3.14)

Таблиця 3.14

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)
Вміст ретикулоцитів, ‰	0-5	13-16	20-23
Контроль	3,44±0,37	77,16±3,16	19,40±1,64
К+БФЕКЛ	3,51±0,26	76,94±3,87	19,55±0,88
ЕЦД	5,20±0,47*	61,48±1,80*	33,39±2,56*
ЕЦД+БФЕКЛ	4,48±0,28*	69,81±1,74 [#]	24,02±1,08 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P<0,05$

Встановлено зростання відсоткового вмісту фізіологічно старих та юних популяцій еритроцитів на 51,2 % і 72,1 %, відповідно, та зниження чисельності фізіологічно зрілих – на 20,3 %. Популяційний склад еритроцитів не змінювався при введенні екстракту *G. officinalis* здоровим щурам. Проте, його введення за умов ЦД призводило до перерозподілу еритроцитів за віком: зростала кількість “фізіологічно зрілих” на 13,5 % та знижувалася – “фізіологічно юних” на 28,1 % еритроцитів щодо діабету (див. табл. 3.14).

Варто зауважити, що за досліджуваної патології підтверджено зниження стійкості до дії кислотного гемолітика еритроцитів популяції “фізіологічно юні”, про що свідчить зниження тривалості гемолізу і часу досягнення його максимуму та підвищення максимальної кількості гемолізованих клітин (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Показники резистентності до дії кислотного гемолітика різновікових популяцій еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

	Популяції еритроцитів	К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
Тривалість гемолізу, хв	П1	4,83±0,17	4,83±0,33	4,50±0,03	5,00±0,29
	П2	6,63±0,24	6,17±0,17	5,40±0,29*	7,00±0,02 [#]
	П3	8,33±0,67	7,67±0,44	6,13±0,47*	8,33±0,80 [#]
Час гемолізу макс. кількості еритроц., хв	П1	2,17±0,33	2,16±0,17	1,88±0,12	2,00±0,29
	П2	3,00±0,001	3,16±0,17	2,50±0,19*	3,33±0,23 [#]
	П3	3,17±0,17	3,50±0,29	2,70±0,12*	3,00±0,31
Мах частка гемоліз. еритроц., %	П1	31,16±3,19	30,87±2,59	31,30±1,40	28,37±0,67 [#]
	П2	30,78±3,03	27,61±1,50	31,23±2,28	31,98±3,40
	П3	26,70±3,84	28,25±1,31	34,99±3,49	26,87±0,61 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

З отриманих результатів, можна зробити висновок, що розвиток ЦД супроводжується зниженням стійкості до дії кислотного гемолітика еритроцитів усіх вікових популяцій. Показано зниження тривалості гемолізу та зсув піку еритрограм ліворуч для популяцій зрілих та юних еритроцитів. У разі введення позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД зростала стійкість еритроцитів різновікових популяцій до дії кислотного гемолітика (табл. 3.15, рис. 3.30).

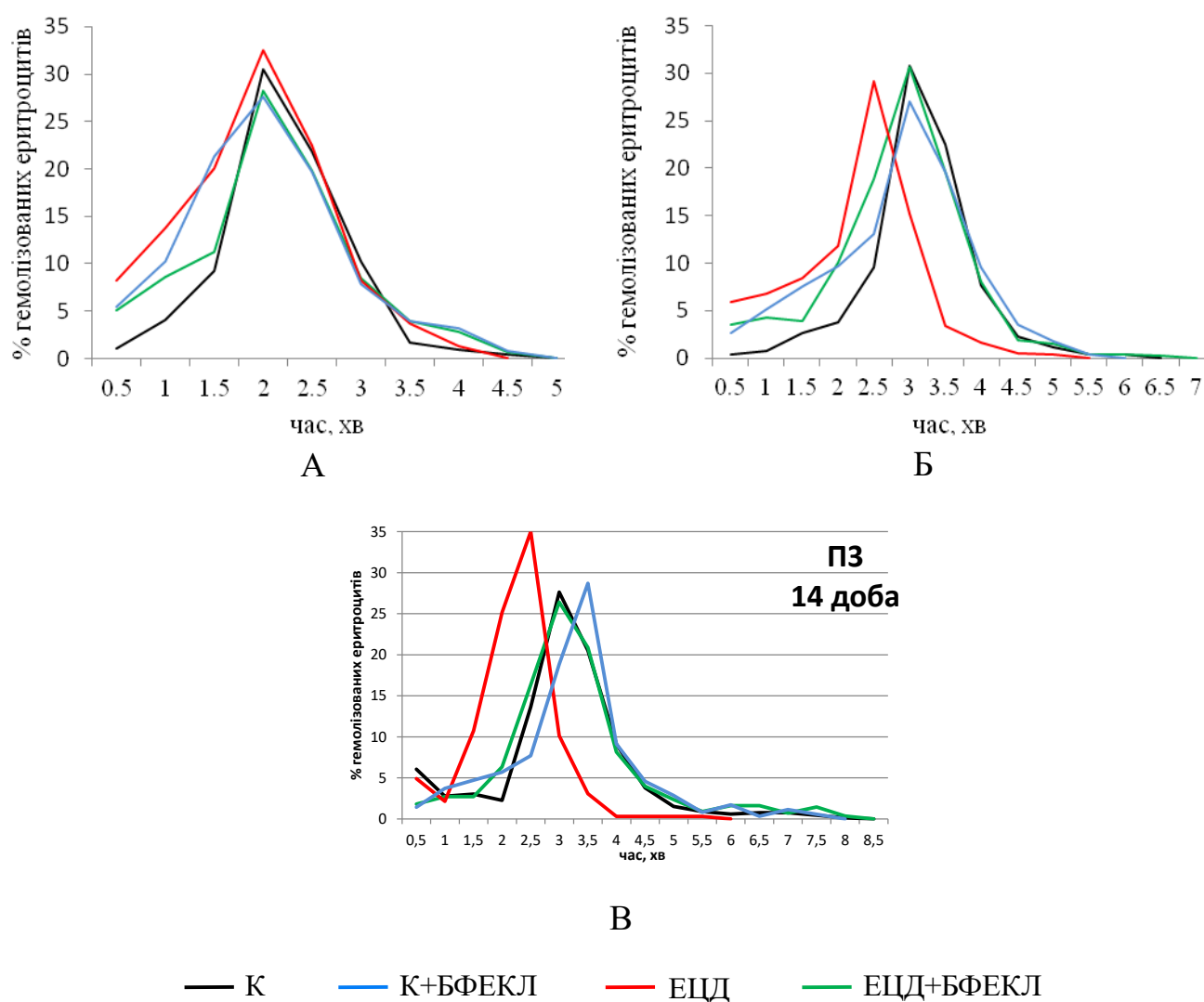


Рис. 3.30. Типові еритрограми щурів різновікових популяцій за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis* (А – “фізіологічно старі”, Б – “фізіологічно зрілі”, В – “фізіологічно юні” еритроцити)

Таким чином, екстракт *G. officinalis* нормалізував порушення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов ЕЦД, що підтверджує його мембраностабілізуючу дію.

Введення тваринам зі стрептозотоцин-індукованим діабетом водних екстрактів листя та екстрактів і суспензій порошку кореневих бульб *S. sonchifolius* зумовлювало підвищення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика. Встановлено збільшення тривалості гемолізу та часу гемолізу максимальної кількості еритроцитів (табл. 3.16, рис. 3.31-3.32). Ці дані вказують на мембранопротекторний ефект фітопрепаратів на основі *S. sonchifolius*.

Таблиця 3.16

Показники резистентності еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов ЕЦД та при введенні екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій порошку кореневих бульб *S. sonchifolius*

Умови експерименту	Тривалість гемолізу, хв	Час гемолізу максимальної кількості еритроцитів, хв	Максимальна частка гемолізованих еритроцитів %
<i>K</i>	<i>9,75±0,99</i>	<i>3,70±0,13</i>	<i>22,56±1,65</i>
K+Ел ⁵⁰⁰	11,13 ± 0,83	3,38 ± 0,43	29,14 ± 4,18
K+Ек ⁵⁰⁰	11,38 ± 1,33	3,25 ± 0,32	18,81 ± 3,65
K+Ск	12,5 ± 2,79	2,25 ± 0,59	26,43 ± 6,58
K+СкPs	15,13 ± 0,32*	3,25 ± 0,15	15,8 ± 0,68*
<i>ЕЦД</i>	<i>7,40±0,37*</i>	<i>2,10±0,19 *</i>	<i>26,29±3,00</i>
ЕЦД +Ел ⁵⁰⁰	12,75 ± 2,15 [#]	3,88 ± 0,72	18,56 ± 2,63
ЕЦД+Ек ⁵⁰⁰	10,83 ± 1,48 [#]	2,83 ± 0,33	24,9 ± 0,89
ЕЦД+Ск	14,25 ± 1,83 ^{*#}	3,13 ± 0,56	24,4 ± 6,41
ЕЦД+СкPs	14,63 ± 0,13 ^{*#}	3,38 ± 0,47 [#]	19,25 ± 1,1 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

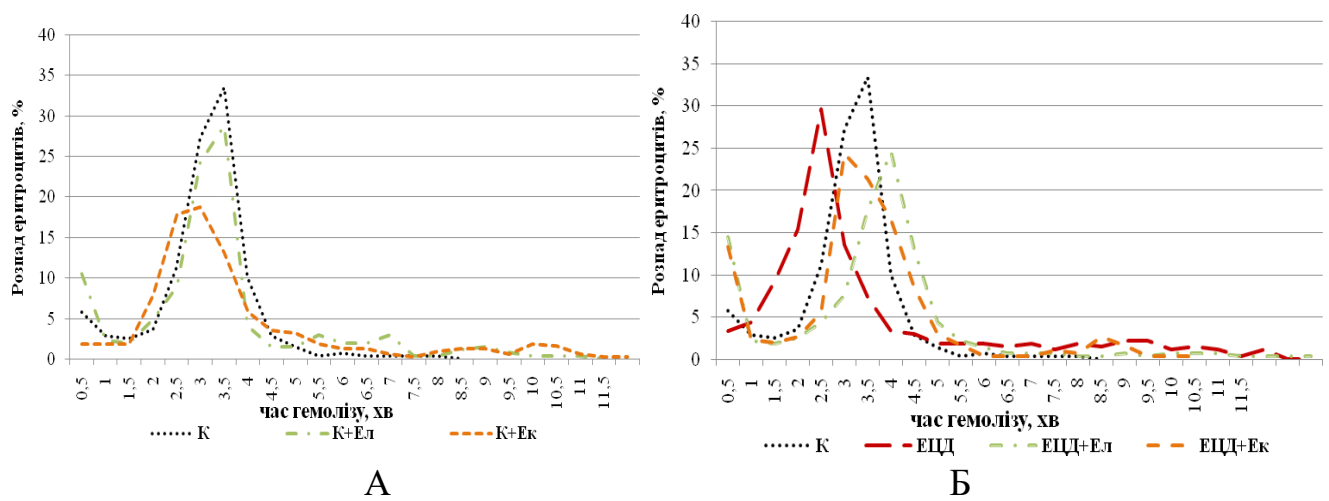


Рис. 3.31. Типові кислотні еритрограми щурів за умов ЕЦД та при введенні водних екстрактів листя і кореневих бульб *S. sonchifolius* здоровим (А) і хворим на діабет (Б) тваринам

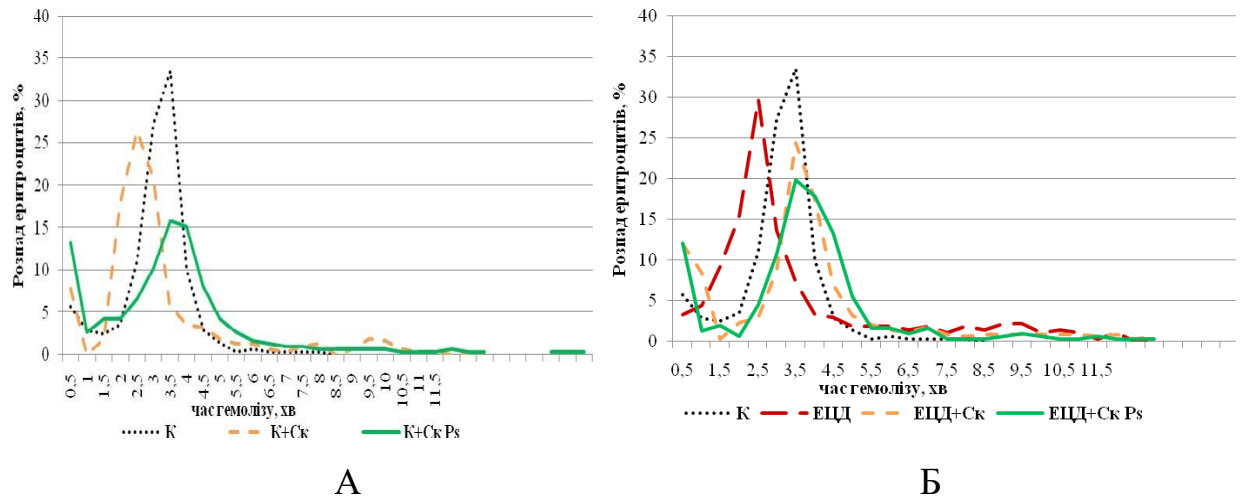


Рис. 3.32. Типові кислотні еритрограми щурів за умов ЕЦД та при введенні суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* здоровим (А) і хворим на діабет (Б) тваринам

Найкращий коригуючий мембранопротекторний ефект виявляли екстракт листя та суспензії порошку кореневих бульб *S. sonchifolius* у стабілізованій і нестабілізованій біосурфактантом PS-17 формах.

Підсумок до розділу

Встановлено порушення структурно-функціонального стану еритроцитів за умов ЕЦД, що виявляється у зміні популяційного складу еритроцитів,

зниженні стійкості усіх популяцій цих клітин до дії кислотного гемолітика, збільшенні кількості та добової продукції ретикулоцитів.

Позбавлений алкалоїдів екстракт *G. officinalis* зумовлював підвищення резистентності еритроцитів до кислотного гемолізу за умов ЕЦД (нормалізуючи перерозподіл різновікових популяцій еритроцитів та підвищуючи їхню стійкість до дії кислотного гемолітика) та нормалізував продукцію ретикулоцитів. Корируючий мембранопротекторний вплив виявляли також екстракт листя та суспензії порошку кореневих бульб *S. sonchifolius* у стабілізованій і нестабілізованій біосурфактантом PS-17 формах.

3.5.2. Структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis* та екстрактів і суспензій *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД

Порушення функціонального стану еритроцитів за умов ЦД супроводжується змінами гліканового профілю плазматичної мембрани. Глікани еритроцитів містять у своїй структурі залишки β -D-галактози, N-ацетил- β -D-глюкозаміну, α -D-манози, L-фукози та значний вміст N-ацетилнейрамінової (сілової) кислоти. Найпоширенішим поверхневим сіалопротейном мембран еритроцитів є глікофорин А (Aoki, 2017). Завдяки високому ступеню сіалювання мембранні глікокон'югати забезпечують найбільший внесок у формування поверхневого негативного заряду еритроцитів. Це має визначальне значення у процесах взаємодії еритроцитів між собою, а також з ендотелієм судин й іншими клітинами крові (Y.-X. Huang et al., 2011; Meiselman et al., 2007; M. Singh & Shin, 2009).

Добре відомо, що за умов ЦД підвищується активність сіалідази що, зумовлює зменшення кількості сіалових кислот на поверхні еритроцитів. В

результаті поверхневий негативний заряд еритроцитів знижується, відповідно, посилюється агрегація еритроцитів (Venerando et al., 2002).

Агрегаційну здатність еритроцитів досліджували використовуючи альціановий блакитний, який вступає в електростатичні взаємодії з негативно зарядженими групами на поверхні клітини, і таким чином знижує негативний заряд плазматичної мембрани. Як наслідок, послаблюються сили відштовхування між еритроцитами і вони агрегують (Rampling et al., 2004).

Дослідженнями альціаніндукованої агрегації еритроцитів за умов ЕЦД виявлено підвищення максимального ступеня агрегації на 96 %, порівняно з контролем, при цьому не відмічено вірогідних змін розмірів агрегатів. Посилення агрегації еритроцитів супроводжується скороченням часу початку агрегації на 40,2 % (табл. 3.16, рис. 3.31). Отримані результати свідчать про зниження фіксованого поверхневого заряду еритроцитів у щурів, основний вклад у формування, якого вносять залишки сіалових кислот, які є у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів (Aoki, 2017).

Таблиця 3.16

Показники альціаніндукованої агрегації еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Умови експерименту	Мах розмір агрегату, у.о.	Мах ступінь агрегації, %
Контроль	3,54±0,58	25,50±1,87
К+БЕКЛ	4,77±0,09	16,00±1,00 *
ЕЦД	3,49±0,58	50,00±4,56 *
ЕЦД+БЕКЛ	5,07±0,92	20,67±1,09 **

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P<0,05$

При введенні екстракту *G. officinalis* позбавленого алкалоїдів здоровим тваринам відмічено вірогідне зниження максимального ступеня агрегації на 37,3 %, щодо контролю та пришвидшення початку агрегації. У тварин з ЕЦД у

разі введення екстракту відмічено нормалізацію показників агрегаційної здатності еритроцитів – часу початку агрегації та максимального ступеня агрегації (табл. 3.16, рис. 3.33).

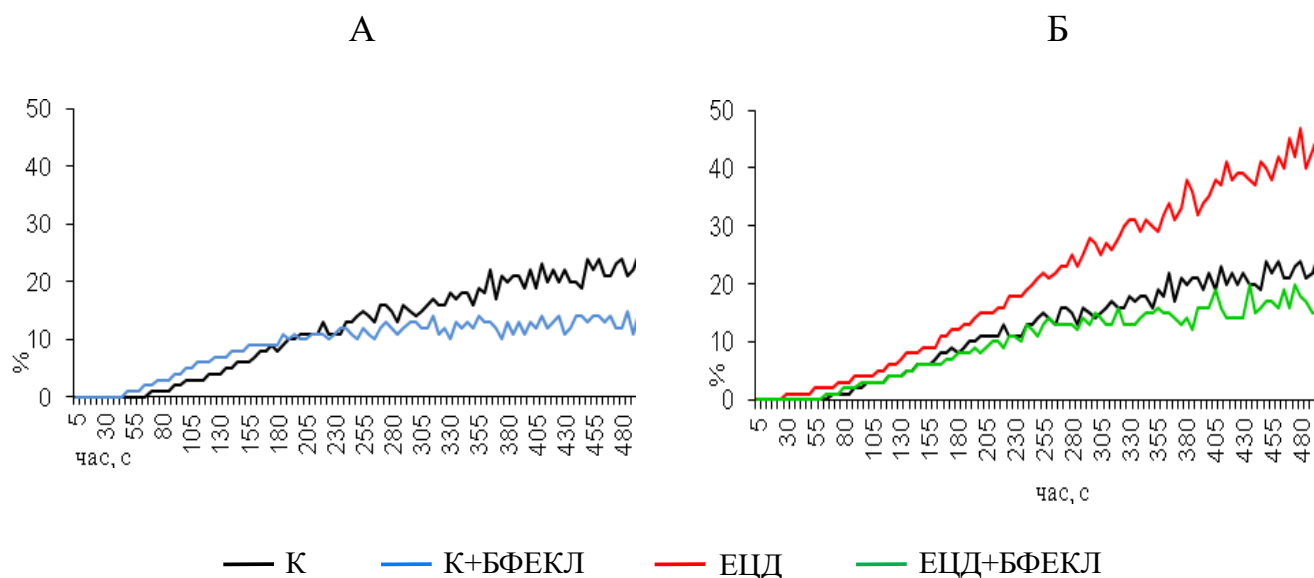


Рис. 3.33. Типові криві альціаніндукованої агрегації еритроцитів за умов введення позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis* здоровим тваринам (А) та тваринам з ЕЦД (Б)

Встановлене нами зростання агрегаційної здатності еритроцитів периферичної крові різного ступеня зрілості за умов ЕЦД відображає підвищення агрегації еритроцитів у різновікових популяціях. Максимальний ступінь агрегації найбільше підвищувався в еритроцитах популяції „фізіологічно юні” (на 240,1 %), натомість максимальний розмір агрегату – у популяції „фізіологічно старі” (на 127,4 %). Агрегаційна здатність різновікових популяцій еритроцитів за введення позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis* здоровим тваринам істотно не змінювалася, порівняно з контролем. Натомість, у тварин з ЕЦД, яким вводили досліджуваний екстракт відмічено нормалізацію показників, що характеризують агрегаційну здатність еритроцитів. спостерігається нормалізація показників альціаніндукованої агрегації, знижується максимальний розмір агрегату та максимальний ступінь агрегації еритроцитів усіх вікових популяцій (табл. 3.17, рис. 3.34).

Типові криві агрегації еритроцитів усіх популяцій набували характеру контрольних. Наближення показників агрегації до значень контролю було характерним і для загальної популяції еритроцитів (рис. 3.34, табл. 3.17). Аналізуючи показники альціаніндукованої агрегації можна зробити висновок, що за умов досліджуваної патології істотно змінюється негативний поверхневий заряд еритроцитів, при чому найбільше у популяції “фізіологічно юні” еритроцити.

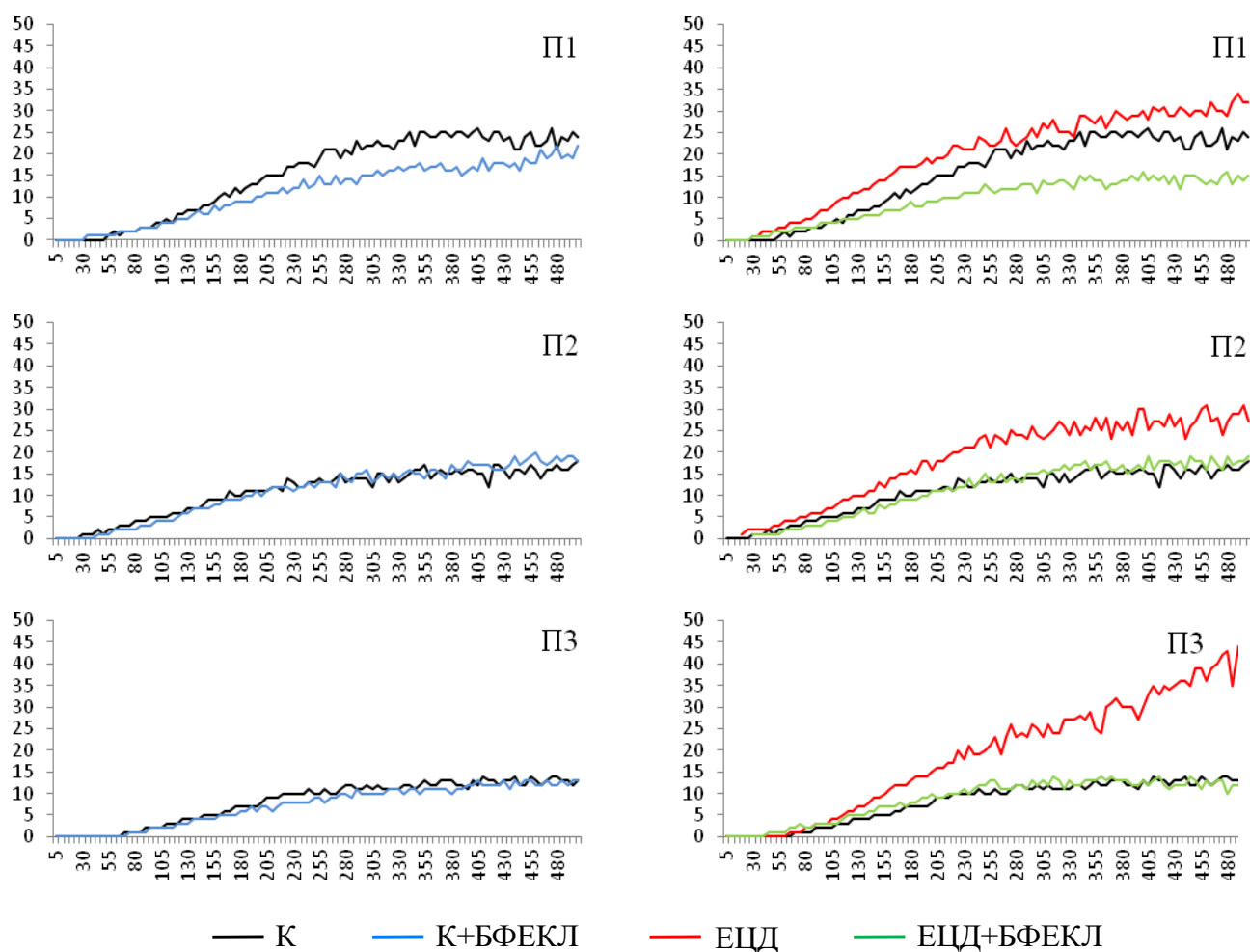


Рис. 3.34. Типові криві альціаніндукованої агрегації еритроцитів різновікових популяцій за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Таблиця 3.17

Показники альціаніндукованої агрегації різновікових популяцій еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

	Популяції еритроцитів	К	К+БЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БЕКЛ
Мах розмір агрегату, у.о.	П1	3,03±0,21	3,05±0,22	6,89±0,72*	2,73±0,19 [#]
	П2	6,62±0,17	4,89±0,14	11,90±1,24*	5,82±0,21 [#]
	П3	4,19±0,43	4,22±0,32	8,18±0,81*	4,97±0,39 [#]
Мах ступінь агрегації, %	П1	23,86±2,98	23,98±1,11	32,47±0,98*	18,47±0,39 [#]
	П2	18,19±0,30	18,55±1,04	32,76±2,42*	18,89±1,03 [#]
	П3	13,09±0,11	13,99±0,89	44,60±2,17*	14,36±1,19 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P<0,05$

Для того, щоб диференціювати задіяність глікозидних зв'язків, якими зв'язані термінальні залишки сіалових кислот з субтермінальними вуглеводами, зокрема, галактозою, у складі олігосахаридних структур глікокон'югатів, досліджували агрегацію еритроцитів використовуючи лектини з різною вуглеводною специфічністю.

При використанні, як індуктора агрегації, лектину зародків пшениці WGA (*Wheat germ agglutinin*), специфічного до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну (β -DGlcNAc), встановлено підвищення максимального ступеня агрегації еритроцитів на 80,5% за умов ЕЦД (табл. 3.18, рис. 3.35). Посилення WGA-індукованої агрегації свідчить про підвищення рівня експонування глікопротеїнів на поверхні еритроцитів, які комплементарні до цього лектину, а саме N-ацетил- β ,D-глюкозаміну.

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 – МАА (*Maackia amurensis agglutinin*) 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 агрегації на 19,4 % при використанні лектину МАА та на 42,9 % при використанні SNA (табл. 3.18, рис 3.33).

Таблиця 3.18

Показники лектиніндукованої агрегації еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

	Лектини	К	К+БЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БЕКЛ
Мак розмір агрегату, у.о.	WGA	4,41±0,52	5,18±0,59	5,23±0,17	3,73±0,35 **
	SNA	2,64±0,16	2,38±0,26	1,99±0,16 *	2,53±0,20 **
	MAA	2,89±0,29	2,85±0,29	2,89±0,32	3,33±0,15
Мак ступінь агрегації, %	WGA	22,98±2,43	21,89±2,55	41,48±3,62 *	25,00±2,61 **
	SNA	5,45±0,43	4,08±0,46	3,11±0,34 *	5,00±0,45 **
	MAA	8,30±0,81	7,83±0,51	6,69±0,63	8,00±0,35

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

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. табл. 3.18, рис. 3.35).

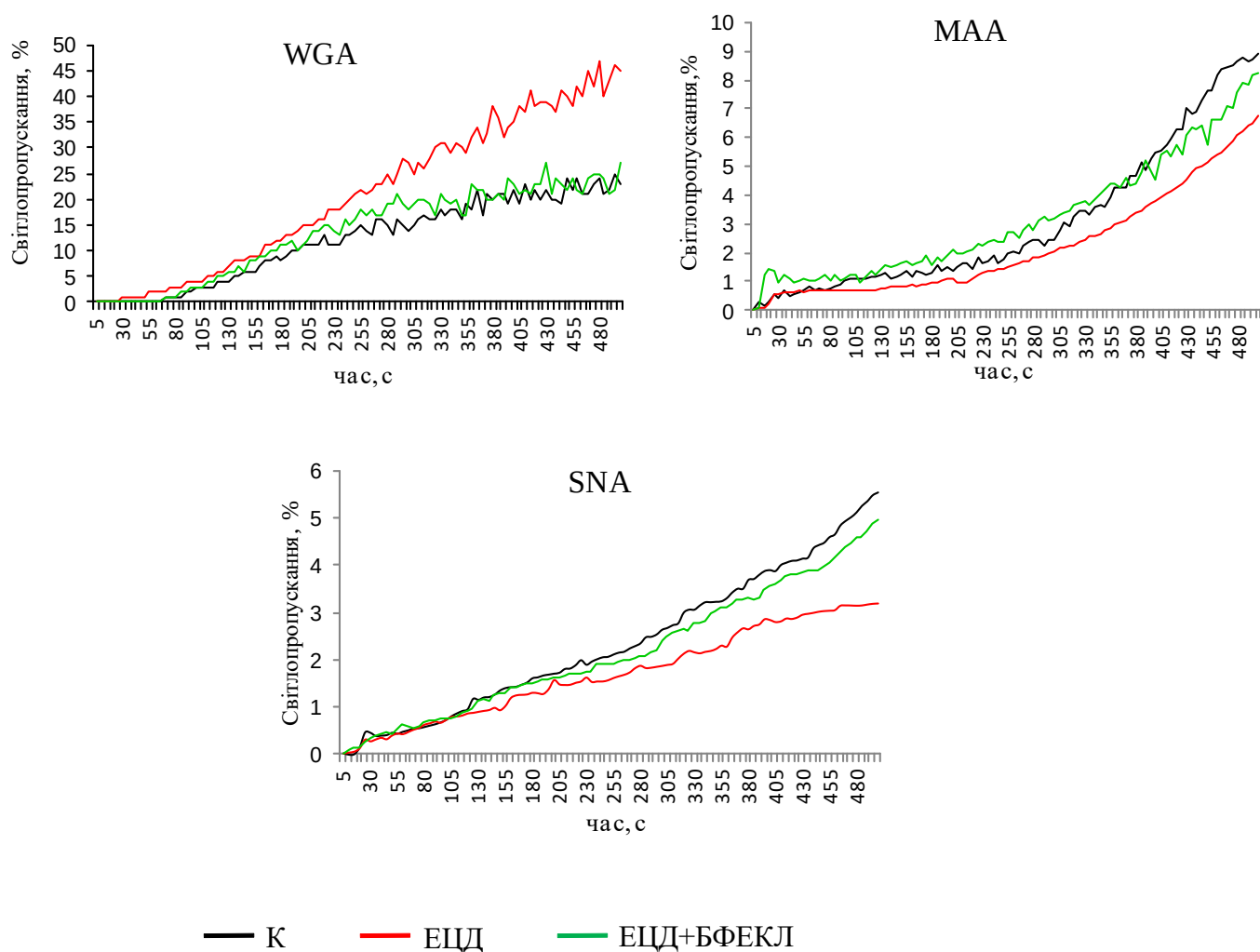


Рис. 3.35. Типові криві WGA, SNA та МАА-індукованої агрегації еритроцитів за умов ЕЦД та при введенні позбавленого алкалоїдів екстракту *G. officinalis*

Введення екстракту *G. officinalis* здоровим тваринам не зумовлювало перерозподілу вуглеводних детермінант глікопротеїнових рецепторів еритроцитів, про що свідчить відсутність вірогідних змін у показниках лектиніндукованої агрегації (табл. 3.18). Натомість введення цього екстракту щурам з ЕЦД призводило до істотного зниження максимального ступеня WGA-індукованої агрегації еритроцитів (на 39,9 %) та зростання максимального ступеня SNA- та МАА-індукованої агрегації з наближенням показників до значень контролю (див. табл. 3.18, рис 3.33).

Отже, застосування екстракту *G. officinalis* на тлі розвитку стрептозототинового діабету приводить до нормалізації агрегаційної здатності еритроцитів завдяки перерозподілу вуглеводних детермінант глікопротеїнових рецепторів еритроцитів, а саме завдяки зниженню експонування субтермінальних залишків N-ацетил- β ,D-глюкозаміну та підвищеному експонуванню N-ацетилнейрамінової кислоти, що приєднані до субтермінальних залишків галактози як $\alpha 2 \rightarrow 3$ так і $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидними зв'язками.

За умов ЕЦД встановлено виражений перерозподіл сіалюваних залишків олігосахаридів у складі рецепторних комплексів у популяції “фізіологічно юні” еритроцити. 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 %) (табл. 3.19). Характер перерозподілу вуглеводних детермінант мембран еритроцитів цієї фракції відповідає змінам у загальній популяції, проте зміни є вираженішими (табл. 3.18-3.19, рис. 3.35).

У популяціях еритроцитів “фізіологічно старі” та “фізіологічно зрілі” виявлено зміни лише WGA-індукованої агрегації, проте характер змін є різноспрямований: максимальний ступінь агрегації зростає (на 97 %) у популяціях “фізіологічно зрілі” та знижується (на 32,5 %) у популяції “фізіологічно старі” еритроцити (табл. 3.19).

Отримані результати вказують на десіалювання вуглеводних детермінант молодих форм еритроцитів при ЕЦД, що може призводити до захоплення цих клітин галактозоспецифічними лектинами в печінці і видалення з кров'яного русла, і свідчить про пришвидшене старіння цих клітин. У відповідь на скорочення тривалості життя еритроцитів відмічено посилення еритропоезу.

Зниження сіалювання глікокон'югатів еритроцитів при ЦД пояснює на молекулярному рівні підвищення їхньої агрегації (Rogers et al., 1992).

Таблиця 3.19

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

Лектини		К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ	
Максимальний ступінь агрегації, %	WGA	П1	40,00±4,33	31,91±1,22	27,00±1,01 [*]	44,00±2,71 [#]
		П2	35,50±3,65	37,82±3,00	70,00±4,00 [*]	40,00±4,13 [#]
		П3	23,20±2,00	21,70±1,51	44,50±1,50 [*]	34,33±0,83 ^{*#}
	SNA	П1	10,00±0,52	9,49±1,67	11,00±0,78	10,67±0,17
		П2	17,67±2,67	16,99±0,96	17,33±1,18	16,00±0,65
		П3	9,00±0,87	9,55±052	2,33±0,33 [*]	5,67±0,76 [#]
	MAA	П1	12,33±1,20	10,84±1,63	11,00±1,08	14,67±0,67
		П2	22,33±0,21	18,44±1,07	24,67±2,75	19,67±1,84
		П3	17,00±0,81	15,92±1,47	7,00±0,52 [*]	12,00±1,03 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; [#] - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Екстракт *G. officinalis*, позбавлений від алкалоїдів не впливав на агрегацію еритроцитів, індуковану додаванням досліджуваних лектинів у здорових тварин. Водночас, при введенні цього екстракту тваринам, хворим на ЦД відмічено зміни WGA-індукованої агрегації еритроцитів усіх трьох популяцій та SNA- і MAA-індукованої агрегації “фізіологічно юних” еритроцитів. У популяції “фізіологічно юні” еритроцити встановлено зниження максимального ступеня WGA-індукованої агрегації на 22,8 % та зростання максимального ступеня SNA- та MAA-індукованої агрегації еритроцитів (відповідно на 143,3 % та 71,4 %) у разі використання безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* за умов діабету. Ці результати вказують на зростання кількості сіалових кислот приєднаних до субтермінальних залишків

вуглеводної частини глікокон'югатів мембран, як $\alpha 2 \rightarrow 6$ так і $\alpha 2 \rightarrow 3$ зв'язками. За введення цього екстракту відмічено нормалізацію показників WGA-індукованої агрегації у популяціях “фізіологічно зрілих” та “фізіологічно старих” еритроцитів (див. табл. 3.19).

Для підтвердження даних, отриманих методом альціан- та лектиніндукованої агрегації еритроцитів, було визначено вміст мембранозв'язаних сіалових кислот. За умов ЕЦД відбувається зниження вмісту сіалових кислот на 32 %, порівняно до контролю, причому у більшій мірі ліпідзв'язаних (на 39,3 %), ніж протеїнзв'язаних (на 28,5 %) (табл. 3.20).

Таблиця 3.20

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	14,77±1,38	5,24±0,18	9,53±0,65
К+БФЕКЛ	13,44±0,92	4,71±0,32	8,73±0,66
ЕЦД	9,99±1,19 *	3,18±0,30 *	6,81±0,22 *
ЕЦД+БФЕКЛ	12,20±1,62	5,00±0,42 #	7,20±0,32 *

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Десіалювання гліколіпідів і глікопротеїнів мембран еритроцитів при досліджуваній патології може бути пов'язано з активацією мембранозв'язаних сіалідаз. В еритроцитах експресується кисла сіалідаза (Neu1), субстратами якої є олігосахариди і глікопептиди та нейтральна (Neu2), яка відщеплює залишки сіалових кислот з олігосахаридів, глікопротеїнів та гліколіпідів (Miyagi & Yamaguchi, 2012; Venerando et al., 2002). Введення екстракту *G. officinalis* за умов ЕЦД призводило до підвищення вмісту ліпідзв'язаних сіалових кислот на

57,2 %, порівняно з діабетом. Натомість рівень протеїнів зв'язаних сіалових кислот за цих умов не змінювався (табл. 3.20).

Розвиток ЕЦД супроводжувався зниженням рівня глікокон'югатів мембран еритроцитів, які містять у своєму складі ($\alpha 2 \rightarrow 6$)- та і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)- зв'язані сіалові кислоти (табл. 3.21). 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 цим цукрам.

За умов ЕЦД встановлено посилення зв'язування галактозоспецифічних лектинів RCA та PNA з поверхневими глікокон'югатами еритроцитів, відповідно на 69 % та 47 % (табл. 3.21). Отримані результати вказують на зменшення кількості залишків сіалових кислот на тлі зростання кількості залишків галактози.

Введення водного екстракту листя *S. sonchifolius* тваринам із ЕЦД коригувало кількісний та якісний склад вуглеводних детермінант глікокон'югатів мембран еритроцитів. Встановлено зростання кількості експонованих на поверхні клітин залишків N-ацетилнейрамінової кислоти у складі олігосахаридної послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal (за зв'язуванням з лектином MAA), β -D-галактози – в олігосахаридній послідовності DGal($\beta 1 \rightarrow 3(4)$)DGlcNAc (за зв'язуванням з лектином RCA). Водночас відмічено зниження кількості експонованих на поверхні клітини залишків N-ацетилнейрамінової кислоти у складі олігосахаридної послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DGalNAc (за зв'язуванням з SNA) та β -D-галактози – у складі DGal($\beta 1 \rightarrow 3$)DGalNAc (за зв'язуванням з PNA), порівняно з ЕЦД.

У контрольних тварин введення водного екстракту листя зумовлювало зростання кількості експонованих на поверхні клітини залишків β -D-галактози (DGal(β 1 $\rightarrow$ 3(4))DGlcNAc) та α -D-манози на фоні зниження N-ацетилнейрамінової кислоти, приєднаної α 2 $\rightarrow$ 6 глікозидним зв'язком (NeuNAc(α 2 $\rightarrow$ 6)DGal/DGalNAc) (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

Лектинензиматичний аналіз глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення водних екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій корневих бульб *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД

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

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Протилежний характер змін ми спостерігали при застосуванні водного екстракту корневих бульб *S. sonchifolius*. Встановлено зниження кількості

експонованих залишків сіалових кислот в олігосахаридних послідовностях NeuNAc(α 2 $\rightarrow$ 6)DGal/DGalNAc і NeuNAc(α 2 $\rightarrow$ 3)DGal та β -D-галактози в олігосахаридній послідовності DGal(β 1 $\rightarrow$ 3(4))DGlcNAc на поверхні мембран еритроцитів на 28 %, 38 % і 32 %, порівняно з ЕЦД. У разі введення екстракту кореневих бульб *S. sonchifolius* здоровим тваринам, лише кількість залишків β -D-галактози (DGal(β 1 $\rightarrow$ 3)DGalNAc) на поверхні мембран еритроцитів не відрізнялася від контрольних значень (табл. 3.21).

Виражений коригуючий вплив на глікановий профіль еритроцитів виявлено при застосуванні стабілізованої форми суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius*. 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.

Таким чином, порівнюючи вплив екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* на глікановий профіль еритроцитів за умов ЕЦД варто зауважити, що коригуючий вплив виявляла лише суспензія кореневих бульб, стабілізована біосурфактантом PS-17.

Підсумок до розділу

Встановлене нами підвищення агрегаційної здатності еритроцитів за умов ЕЦД вказує на зниження негативного поверхневого заряду цих клітин, що зумовлено зниженням вмісту мембранозв'язаних сіалових кислот як у складі глікопротеїнів, так і гліколіпідів, приєднаних як (α 2 $\rightarrow$ 6)-, так і (α 2 $\rightarrow$ 3)-глікозидними зв'язками до субтермінальних залишків цукрів. Це свідчить про пришвидшене старіння еритроцитів за досліджуваної патології. Компенсаторною реакцією у відповідь на скорочення тривалості життя еритроцитів за ЦД є стимуляція еритропоезу.

Застосування суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* сприяло нормалізації гліканового профілю мембран еритроцитів завдяки перерозподілу вуглеводних детермінант мембран еритроцитів, а саме завдяки зростанню

вмісту N-ацетилнейраміновмісних глікокон'югатів на тлі зменшення вмісту β -D-галактозовмісних глікокон'югатів.

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.

Зростання ступеня сіалювання глікокон'югатів мембран еритроцитів при введенні фітопрепаратів на основі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та суспензії *S. sonchifolius* за умов ЦД свідчить про активацію сіалідаз та/або зниження активності сіалілтрансфераз і пояснює на молекулярному рівні зниження агрегаційної здатності цих клітин.

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 характерною ознакою омолодження пулу еритроцитів у кров'яному руслі.

Публікації:

1. 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. Сибірна // Мед. та клін. хімія. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 28–33.

2. Горбулінська О. Вплив якона (*Smalanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) 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. http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_71_4.

3.6. Корируючий 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

3.6.1. Екстракт безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* зумовлює реорганізацію актинового цитоскелету та перерозподіл сіаловмісних глікокон'югатів мембран лейкоцитів

Для дослідження кількості вуглеводних детермінант мембрани лейкоцитів та їхнього перерозподілу за структурними особливостями у складі поверхневих глікокон'югатів, які є центральною ланкою у відтворенні механізмів клітинної рецепції, у нормі та при ЦД як молекулярні зонди застосовували лектини. Розвиток ЕЦД супроводжувався збільшенням максимального ступеня WGA-індукованої агрегації (на 71%) та зниженням цього показника при використанні у ролі індукторів агрегації лектинів MAA та SNA (на 41 та 53% відповідно) (табл. 3.22, рис. 3.34). Зниження MAA- та SNA-індукованої агрегації може опосередковано свідчити про активацію нейрамінідази при цукровому діабеті. Активність цього ензиму залежить від багатьох чинників, зокрема, значення рН крові, яке за умов цієї патології знижується внаслідок розвитку метаболічного ацидозу та гіпоксії через відносний та /або абсолютний дефіцит інсуліну (Miyagi & Yamaguchi, 2012; Rampling et al., 2004).

Отже, отримані результати свідчать про структурні перебудови олігосахаридних фрагментів сіаловмісних глікокон'югатів мембран лейкоцитів за ЕЦД. За досліджуваної патології у більшій мірі експонуються залишки N-ацетил- β ,D-глюкозаміну та зменшується 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 олігосахаридів вуглеводних компонентів мембранних глікопротеїнів. Кількісний перерозподіл глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант призводить до порушення агрегаційної й адгезивної здатності цих клітин.

У разі введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* здоровим тваринам показники агрегації лейкоцитів, індукованої лектинами бузини чорної та акації амурської, не відрізнялися від контролю. Водночас, знижувалася агрегаційна здатність цих клітин, індукована лектином зародків пшениці.

У тварин з ЕЦД за впливу цього екстракту показано підвищення SNA- і MAA- та зниження WGA-стимульованої агрегації (табл. 3.22, рис. 3.34).

Таблиця 3.22

Лектиніндукована агрегація лейкоцитів за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Max ступінь агрегації, %		К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БЕКЛ
Лектини	WGA	21,20 $\pm$ 0,58	13,50 $\pm$ 0,52*	36,31 $\pm$ 1,99 *	22,15 $\pm$ 0,79 #
	MAA	71,84 $\pm$ 1,25	70,82 $\pm$ 1,26	42,38 $\pm$ 1,65 *	69,53 $\pm$ 1,33 #
	SNA	8,04 $\pm$ 0,02	7,06 $\pm$ 0,73	3,79 $\pm$ 0,31 *	5,28 $\pm$ 0,56 #

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з діабетом, $P < 0,05$

Не виключено, що такий ефект обумовлений впливом біологічно активних речовин екстракту на активність ензимів, задіяних у відщепленні чи перенесенні залишків сіалових кислот (нейрамінідази та транс-сіалідази)(Miyagi & Yamaguchi, 2012).

Варто зауважити, що при ЕЦД відбуваються подібні зміни у сіалюванні глікокон'югатів на поверхні мембран, як еритроцитів так і лейкоцитів, проте у лейкоцитах відмічено вагомішу втрату залишків ($\alpha 2 \rightarrow 6$)- та ($\alpha 2 \rightarrow 3$)- зв'язаних сіалових кислот (табл. 3.18, 3.22, рис. 3.35-3.36).

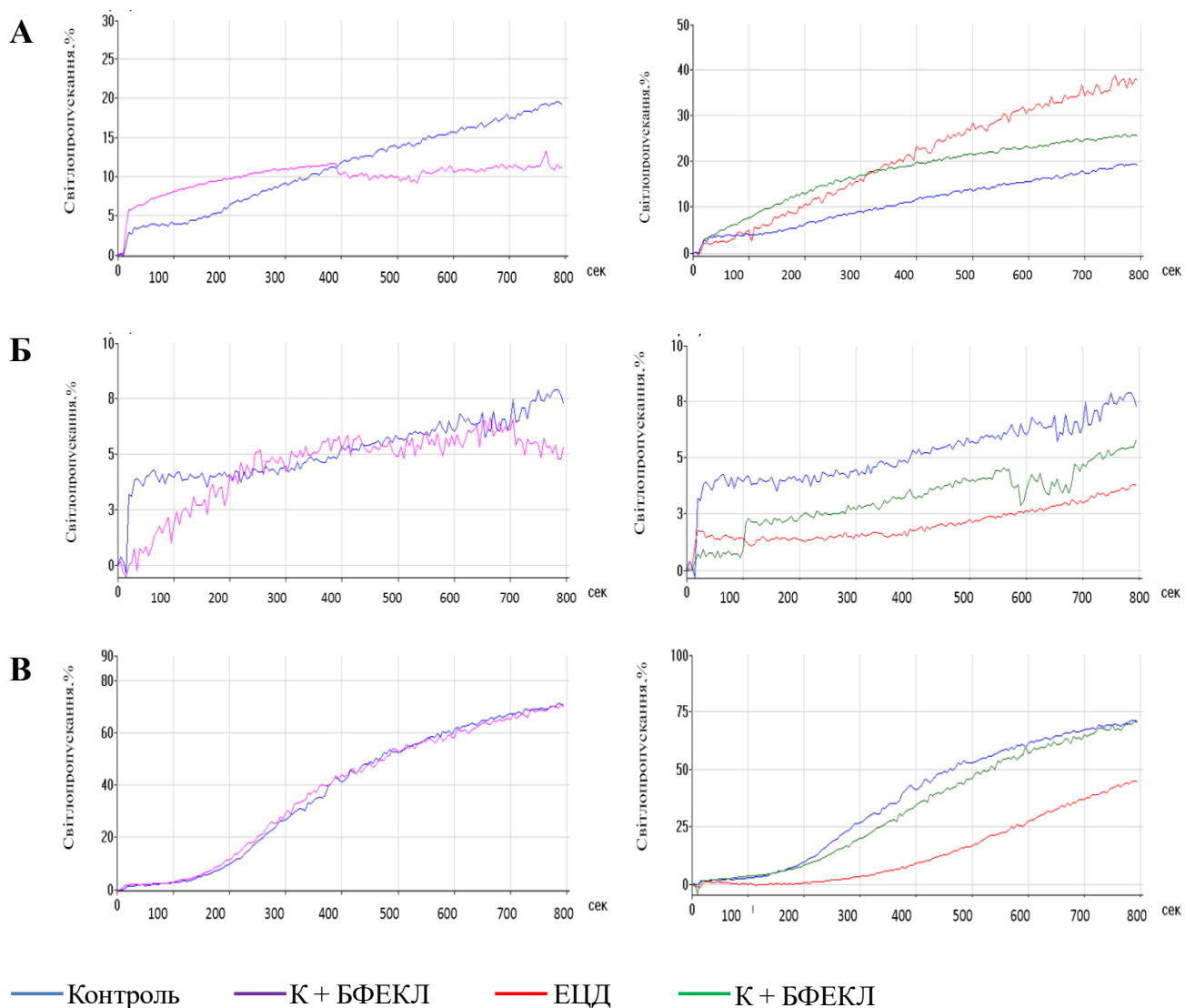


Рис. 3.36. Типові криві агрегації лейкоцитів за умов введення БФЕКЛ здоровим тваринам та тваринам з ЕЦД із різними лектинами у ролі індукторів агрегації: (А) – WGA, (Б) – SNA та (В) – МАА

Отже, отримані результати свідчать про структурні перебудови олігосахаридних фрагментів сіаловмісних глікокон'югатів мембран лейкоцитів за ЕЦД. За досліджуваної патології у більшій мірі експонуються залишки N-ацетил- β ,D-глюкозаміну та зменшується 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 олігосахаридів вуглеводних компонентів мембранних глікопротеїнів. Кількісний перерозподіл глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант призводить до модифікації сигнальних мереж, задіяних у міжклітинних взаємодіях, та до порушення агрегаційної й адгезивної здатності цих клітин.

При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* здоровим тваринам не виявлено вірогідних змін лектиніндукованої агрегації лейкоцитів. Натомість, у разі застосування цього екстракту за умов ЕЦД показано зниження показників WGA-індукованої агрегації (максимального ступеня агрегації та розміру агрегату відповідно на 38,0% та на 29,8%) та підвищення показників SNA- та МАА-стимульованої агрегації (максимального ступеня агрегації відповідно на 45,0% та 57,9%). При цьому варто зазначити, що рівень WGA- та МАА-індукованої агрегації відповідав значенням контролю (табл. 3.22, рис. 3.34).

Встановлений нами кількісний перерозподіл глікокон'югатів мембран лейкоцитів з різною структурою вуглеводних детермінант при захворюванні на ЦД повинен впливати на кількісні зміни субтермінального моносахариду – β ,D-галактози, який “демаскується” у разі активації мембранозв'язаних сіалідаз. Міжмолекулярні взаємодії, опосередковані 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-Rodríguez 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. На сьогоднішній день рухливість лейкоцитів розглядають як важливий показник їхнього фізіологічного стану.

Методом протокової цитометрії із застосуванням фалоїдину міченого ТРІТЦ проведено кількісну оцінку вмісту F-актину в лейкоцитах периферичної крові щурів усіх чотирьох досліджуваних груп тварин (рис. 3.37 А, Б). Оцифровані результати інтенсивності сигналів флюоресценції на мікрофотографіях представлені середнім показником флюоресценції (середнім арифметичним значенням сили свічення суспензії клітин (2×10^4)), який виражали в у.о.

Аналізуючи результати проведених досліджень, було встановлено що вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові за ЕЦД був удвічі вищим порівняно з контрольною групою тварин. Ці дані вказують на преактивований стан лейкоцитів за умов ЦД, який характеризується формуванням на поверхні клітини значної кількості коротких псевдоподій (Hannigan et al., 2001). Підвищення рівня полімеризованого актину призводить до порушення відповіді клітини під час інтегрин-залежної взаємодії з ендотелієм судин. При цьому послаблюється адгезія лейкоцитів до ендотеліальних клітин та порушується процес проникнення лейкоцитів через стінку судини під час запального процесу (Advani et al., 2004).

При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД вміст F-актину в лейкоцитах достовірно знижувався (на 20%), порівняно з діабетом, проте перевищував контрольні значення (рис. 3.37, Б).

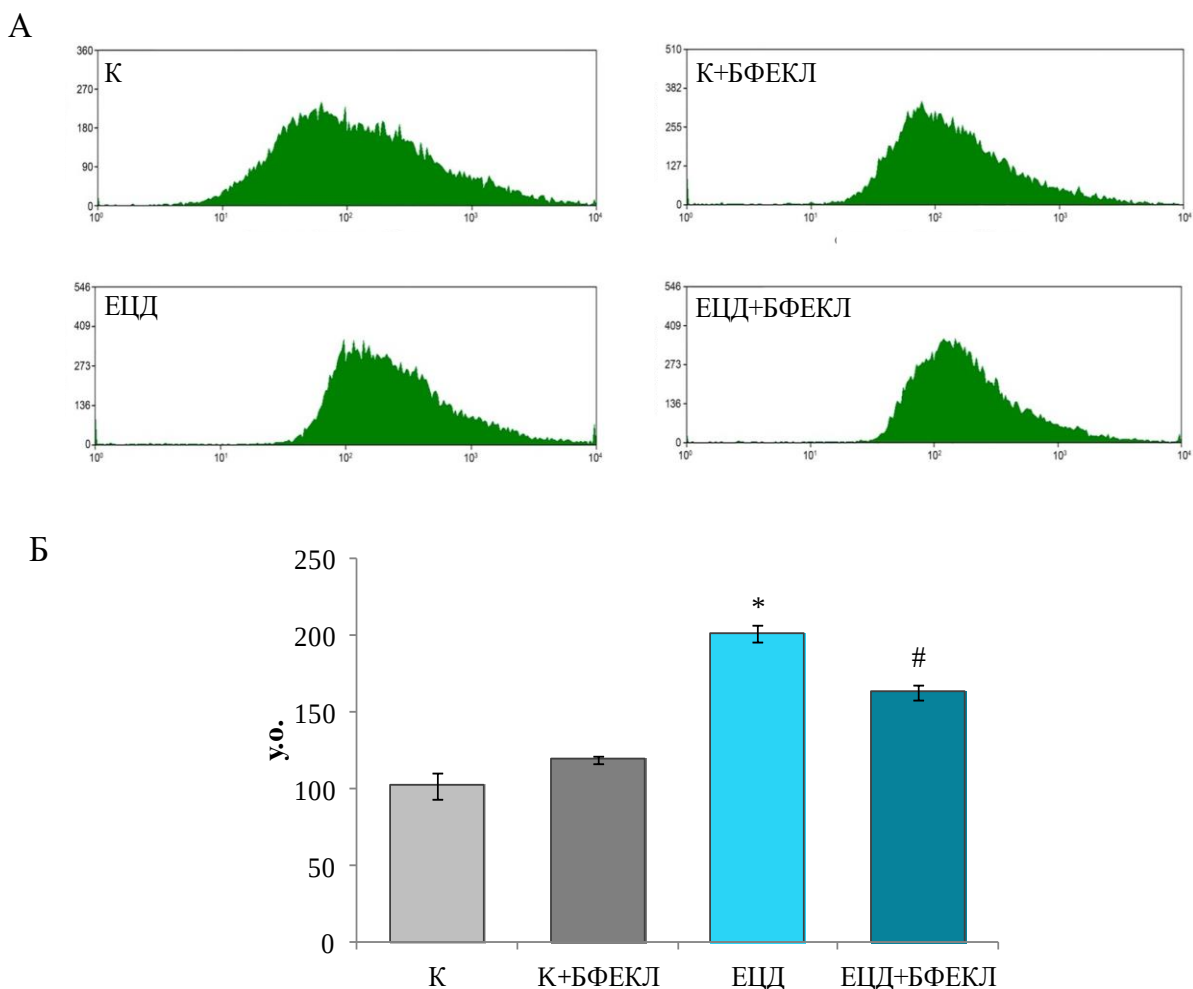


Рис. 3.37. Гістограми інтенсивності флуоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ у лейкоцитах периферичної крові щурів (А) (по вертикалі: кількість подій; по горизонталі: флуоресценція за каналом FL2, ум. од.) та оцифровані дані гістограм, що відображають рівень полімеризованого актину у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флуоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ (Б)

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з діабетом, $P < 0,05$

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 безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*.

На рис. 3.38 наведено результати імуноблот-аналізу актинових філаментів цитоскелету, коротких філаментів і мономерів актину.

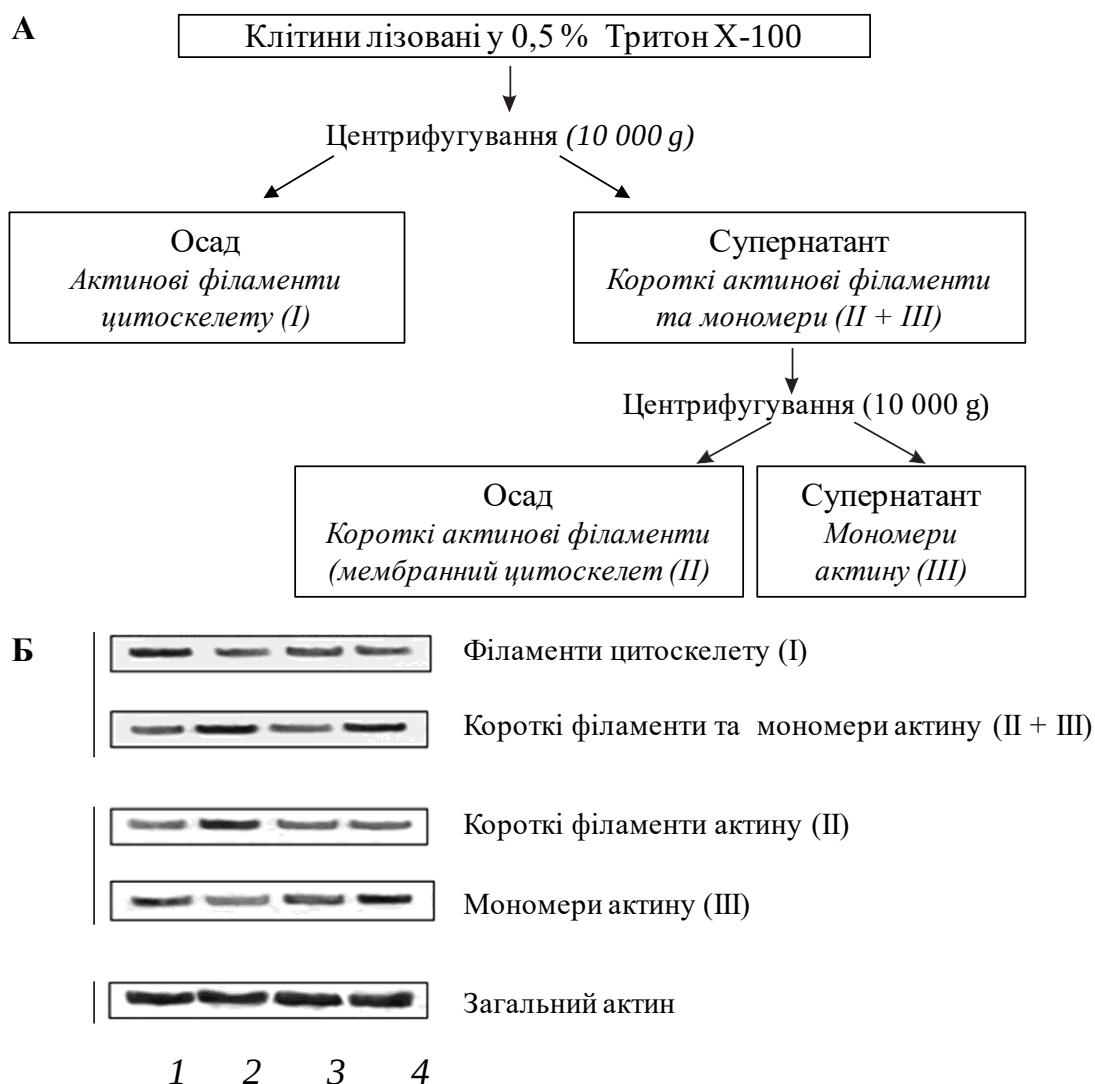


Рис. 3.38. Імуноблот-аналіз рівня актину у лейкоцитах щурів у нормі, за умов ЕЦД та введення БФЕКЛ (1 – контроль, 2 – контроль + БФЕКЛ, 3 – ЕЦД, 4 – ЕЦД + БФЕКЛ); а – схема фракціонування клітинних лізатів, отриманих лізисом за допомогою 0,5 % Тритон Х-100, з метою розділення фракцій, що містили довгі філаменти та мономер 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 мономер актину (III)

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 мономер 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. 3.39).

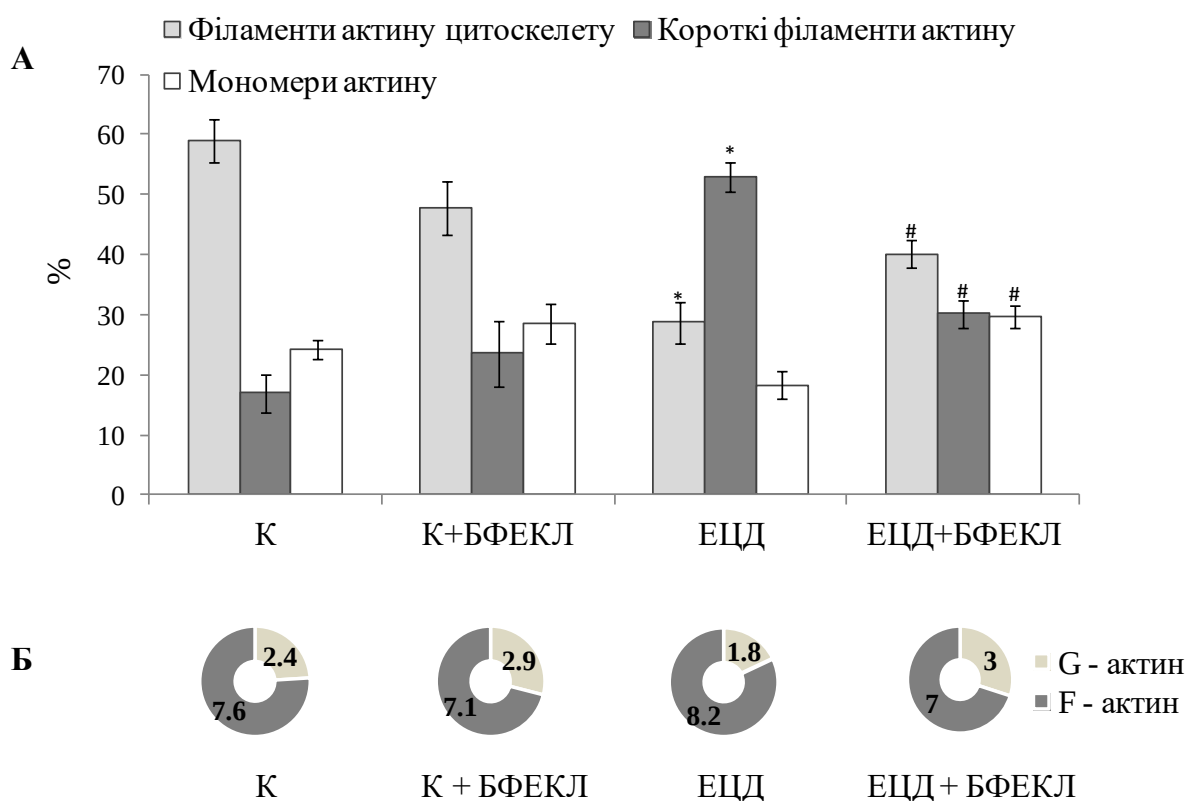


Рис. 3.39. Вміст актину у фракціях лізатів лейкоцитів, що містили довгі актинові філаменти, короткі філаменти та мономер актину (А) та співвідношення вмісту полімеризованого актину щодо мономерів актину (Б). Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів (рис. 3.38 Б). Вміст актину у кожній фракції виражений як відсоток від загального вмісту актину визначений для відповідної групи.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з діабетом, $P < 0,05$

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. 3.39 Б).

При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам контрольної групи вміст актину в окремих фракціях лізатів лейкоцитів розподілявся як $47,8 \pm 4,5$ % у фракції, яка містила філаменти цитоскелету, $23,5 \pm 5,3$ % формували короткі актинові філаменти і $29,7 \pm 2,3$ % припадало на мономер актину. Введення екстракту тваринам з ЕЦД призводило до перерозподілу цих трьох форм актину у такому відсотковому співвідношенні – $40,2 \pm 2,4$, $30,1 \pm 2,2$ і $28,7 \pm 1,8$. Таким чином співвідношення полімеризованого актину до мономерів актину становить $7,1 : 2,9$ у лейкоцитах 2-ї групи та $7,0 : 3,0$ у 4-й групі. Отже, у разі введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* контрольним тваринам рівень F-актину у лейкоцитах не змінювався, натомість знижувався у тварин хворих на цукровий діабет (рис. 3.38 Б - 3.39).

Вивчаючи особливості реорганізації актинового цитоскелету у лейкоцитах за введення досліджуваного екстракту тваринам з ЕЦД було встановлено, що на фоні зниження вмісту полімеризованого актину відбувається виражена деполімеризація коротких актинових філаментів, яка супроводжується, як утворенням мономерів актину так і його полімеризацією з утворенням фракції філаментів цитоскелету. Вміст коротких актинових філаментів у лейкоцитах знижувався у 2,2 рази, а вміст мономерів актину та філаментів цитоскелету збільшувався у 2,5 та 1,3 рази, відповідно, порівняно з ЕЦД. Введення екстракту тваринам контрольної групи зумовлювало деполімеризацію актинових філаментів цитоскелету на тлі інтенсифікації

полімеризації актину у фракції коротких філаментів, порівняно з контролем (рис. 3.38 Б - 3.39 А).

Здатність лейкоцитів до міграції залежить від наявності молекул клітинної адгезії на поверхні як ендотелію, так і лейкоцитів, рухливості самих клітин, а також від наявності хемокінів. TNF- α є плейотропним прозапальним цитокіном, який регулює процеси клітинної проліферації, диференціювання, міграції та апоптозу через активацію різних сигнальних каскадів (Baud & Karin, 2001; Nakao et al., 2003) .

У групі тварин зі стрептозотоциновим діабетом встановлено зростання вмісту TNF- α у плазмі крові щурів на 46 %, порівняно з контролем (рис. 3.40).

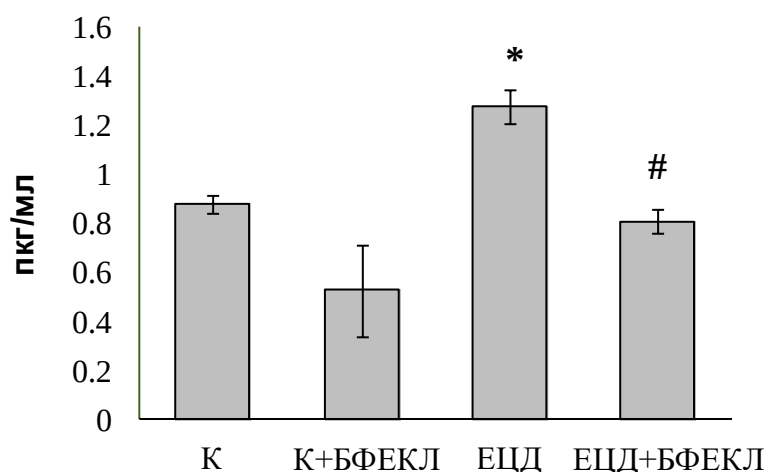


Рис. 3.40 Вміст TNF- α у плазмі крові щурів за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з діабетом, $P < 0,05$

У тварин з ЕЦД, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* відмічено зниження вмісту TNF- α до рівня фізіологічних значень (рис. 3.40), що узгоджується зі змінами показників, які характеризують преактивований стан лейкоцитів (рис. 3.39).

Публікації:

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. Genet – 2017. – Vol. 51, No. 3. – P. 162–172.

3.6.2. Екстракти і суспензії *S. sonchifolius* та безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* модулюють фагоцитарну та метаболічну активність нейтрофілів за умов ЕЦД

Характеристика функціональної активності лейкоцитів при ЦД має важливе значення для розуміння імунологічних процесів, пов'язаних із патогенезом захворювання. В останні роки з'явилася низка публікацій, які доводять те, що у патогенезі ЦД 1 типу важливе значення має не лише адаптивний імунітет, але й клітини вродженого імунітету, особливо нейтрофіли (Atkinson et al., 2015; Roer, 2013). Відомо, що за умов ЕЦД порушується хемотаксис, фагоцитарна та бактерицидна активність нейтрофілів. Це сприяє підвищенню схильності до інфекцій хворих на ЦД, збільшує ризик виникнення діабетичних ускладнень та смертність пацієнтів (Alba-Loureiro et al., 2007; Atkinson et al., 2015). Тому на наступному етапі досліджень нами було вивчено здатність біологічно активних речовин, виділених зі *S. sonchifolius* та *G. officinalis* модулювати фагоцитарну та метаболічну активність нейтрофілів при ЦД.

Ключовим етапом фагоцитозу є поглинання антигену. Фагоцитарну здатність нейтрофільних гранулоцитів оцінювали визначаючи фагоцитарний індекс (ФІ), який характеризує інтенсивність фагоцитозу, фагоцитарне число (ФЧ), що відображає поглинаючу здатність цих клітин та індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) (Беркало et al., 2003). У тварин з ЕЦД встановлено зниження кількості фагоцитуючих клітин (ФІ₃₀) та кількості клітин дріжджів поглинутих

одним нейтрофілом ($\Phi\text{Ч}_{30}$) за умов інкубації нейтрофілів з клітинами дріжджів протягом 30 хв відповідно на 16,5 % та 19,3 %, щодо контролю. Проте, за умов тривалішої інкубації впродовж 120 хв встановлено зростання ΦI_{120} та $\Phi\text{Ч}_{120}$, відповідно на 28,8 % та 20,3 % (табл. 3.23). Отримані результати вказують на те, що за досліджуваної патології нейтрофіли повільніше вступають у фагоцитоз, порівняно з клітинами здорових тварин.

Таблиця 3.23

Показники фагоцитарної активності нейтрофілів
у тварин з ЕЦД при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*

Умови експерименту	Кількість клітин дріжджів, %			
	ΦI_{30}	ΦI_{120}	$\Phi\text{Ч}_{30}$	$\Phi\text{Ч}_{120}$
К	13,17±0,73	14,75±0,88	1,76±0,03	1,53±0,09
К+Ел ⁷⁰	12,83±0,44	29,17±4,78*	1,52±0,03*	1,62±0,08
К+Ел ⁵⁰⁰	12,33±0,35	19,07±1,68*	1,49±0,02*	1,85±0,04*
К+Ек ⁷⁰	10,50±0,29*	17,83±1,42*	1,71±0,06	1,77±0,07*
К+Ек ⁵⁰⁰	11,53±0,34*	16,45±1,32	1,68±0,05	1,72±0,02*
К+Ск	11,89±0,56	16,54±1,74	1,73±0,04	1,83±0,03*
К+Ск ^{Ps}	12,99±0,64	16,89±1,36	1,69±0,07	1,63±0,07
ЕЦД	11,00±1,5*	19,00±0,50*	1,42±0,08*	1,84±0,08*
ЕЦД+Ел ⁷⁰	23,50±1,04*#	25,83±1,17*#	1,98±0,04*#	1,99±0,04*
ЕЦД +Ел ⁵⁰⁰	21,43±0,93*#	15,63±1,07#	1,76±0,02#	1,73±0,04*
ЕЦД+Ек ⁷⁰	16,50±1,19*#	20,50±2,46*	1,52±0,04*	1,55±0,16
ЕЦД+Ек ⁵⁰⁰	15,55±1,03*#	17,33±1,56	1,58±0,05*	1,78±0,11
ЕЦД+Ск	17,33±1,10*#	16,23±1,36#	1,64±0,03*#	1,51±0,07#
ЕЦД+Ск ^{Ps}	17,45±1,16*#	15,45±1,05#	1,73±0,02#	1,58±0,13

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

При введенні водного екстракту листя *S. sonchifolius* у дозах 70 та 500 мг/кг у тварин з ЕЦД відмічено зростання ΦI_{30} на 113,6 % і 94,8 % та $\Phi Ч_{30}$ на 39,4 % та 23,9 %, відповідно. При тривалішій інкубації відмічено різноспрямовані зміни кількості фагоцитуючих клітин: за впливу нижчої концентрації екстракту підвищується ΦI_{120} на 35,9 %, натомість у дозі 500 мг/кг знижується ΦI_{120} на 17,7 %, порівняно з діабетом. При цьому інтенсивність фагоцитозу ($\Phi Ч_{120}$) не змінювалася. У контрольних тварин екстракт листя в обох досліджуваних концентраціях зумовлював зниження $\Phi Ч_{30}$ нейтрофілів на 13,6 % (70 мг/кг) та 15,3 % (500 мг/кг), тоді як ΦI_{120} зростав на 97,8 % (70 мг/кг) і 29,3 % (500 мг/кг) та $\Phi Ч_{120}$ на 20,9 % (500 мг/кг), порівняно з контролем (табл. 3.23).

При введенні водного екстракту кореневих бульб *S. sonchifolius* у дозах 70 та 500 мг /кг тваринам з ЕЦД відмічено зростання ΦI_{30} , відповідно на 41,4 % і 50,0 %, порівняно з ЕЦД, проте не виявлено вірогідних змін ΦI_{120} так і $\Phi Ч_{120}$. У тварин контрольної групи, яким вводили екстракт кореневих бульб *S. sonchifolius* відмічено зниження ΦI_{30} відповідно на 20,3 % (70 мг/кг) і 12,5 % (500 мг/кг), та зростання ΦI_{120} на 20,9 % (70 мг/кг). Показник $\Phi Ч$ підвищувався лише за умов тривалішої інкубації впродовж 120 хв на 15,7 % (70 мг/кг) і 12,4 % (500 мг/кг), порівняно з контролем (табл 3.23).

Застосування нестабілізованої та стабілізованої суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* зумовлювало зростання ΦI_{30} (відповідно на 57,6 % і 58,6 %) та $\Phi Ч_{30}$ (на 15,5 % і 21,8 %), а також зниження ΦI_{120} (на 14,6 % і 18,7 %) та $\Phi Ч_{120}$ (на 17,9 % і 14,1 %), порівняно з ЕЦД. Отже, обидві форми суспензії кореневих бульб нормалізували ΦI та $\Phi Ч$ за умов ЕЦД, проте не зумовлювали статистично вірогідних змін цих показників у контрольних тварин (табл 3.23).

На основі отриманих результатів нами було обраховано ІЗФ, який визначали за співвідношенням середньої кількостю фагоцитованих клітин

дріжджів (ФЧ) на різних термінах інкубації – через 30 і 120 хв. Індекс завершеності фагоцитозу характеризує перетравлювальну здатність нейтрофільних гранулоцитів.

У контрольних тварин ІЗФ становив $1,2 \pm 0,03$ та вказує на завершеність фагоцитозу, тоді як у тварин з ЕЦД знижувався на 32,2 % порівняно з контролем, і становив $0,9 \pm 0,04$ (рис. 3.24). Значення ІЗФ менше за 1,0 свідчить про зниження кілерної функції нейтрофілів. Застосування водних екстрактів листя і кореневих бульб *S. sonchifolius* у різних досліджуваних концентраціях та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* коригують зміни фагоцитарної активності нейтрофілів за умов ЕЦД, на що вказує зростання ІЗФ при їхньому застосуванні (рис. 3.41).

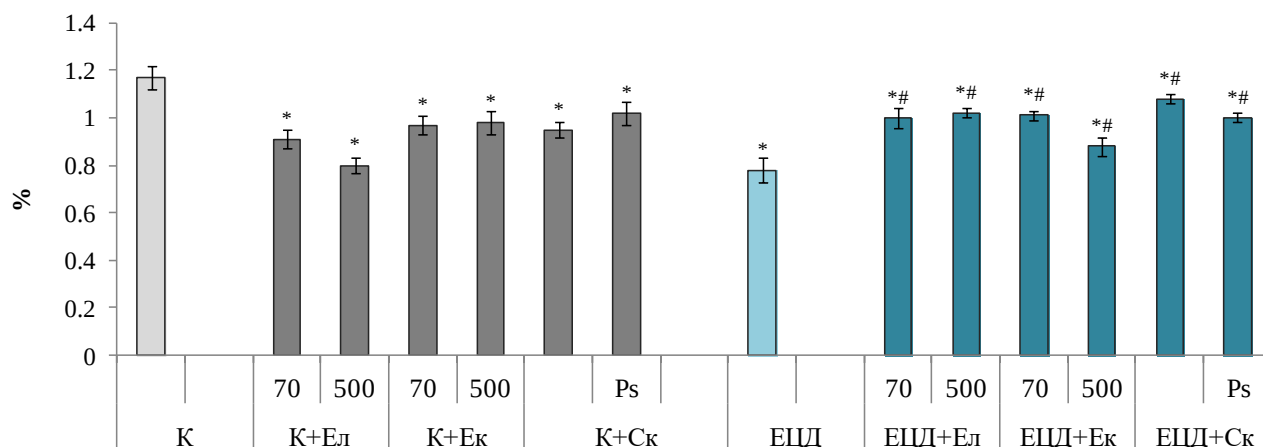


Рис. 3.41. Індекс завершеності фагоцитозу за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Важливим етапом фагоцитозу є кілінг патогена, що може реалізуватися за кисеньнезалежним та кисеньзалежним механізмами (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Незалежний від кисню механізм реалізується за допомогою лізосомальних гідролітичних ензимів та цитотоксичних протеїнів – перфоринів, які руйнують плазматичну мембрану чужорідної клітини (Elsbach & Weiss, 1985). Механізм кисеньзалежного кілінгу включає активацію ензимів, головню,

NADPH-оксидази і мієлопероксидази, які каталізують утворення АФО. Це у свою чергу, спричинює респіраторний вибух, спрямований на додаткову деградацію патогена. Поєднання лізису і респіраторного вибуху забезпечує високу ефективність елімінації антигену.

За умов ЕЦД не виявлено істотних змін кисень-незалежних механізмів елімінації мікроорганізмів, які опосередковані катіонними білками. СЦК реакції на вміст катіонних протеїнів у нейтрофілах практично не змінювався (рис. 3.40). Після чотирнадцятиденного курсу введення екстрактів та суспензій надземної та кореневої частин *S. sonchifolius* вірогідних змін показника СЦК катіонних протеїнів у здорових та хворих на ЦД тварин не виявлено (рис. 3.42).

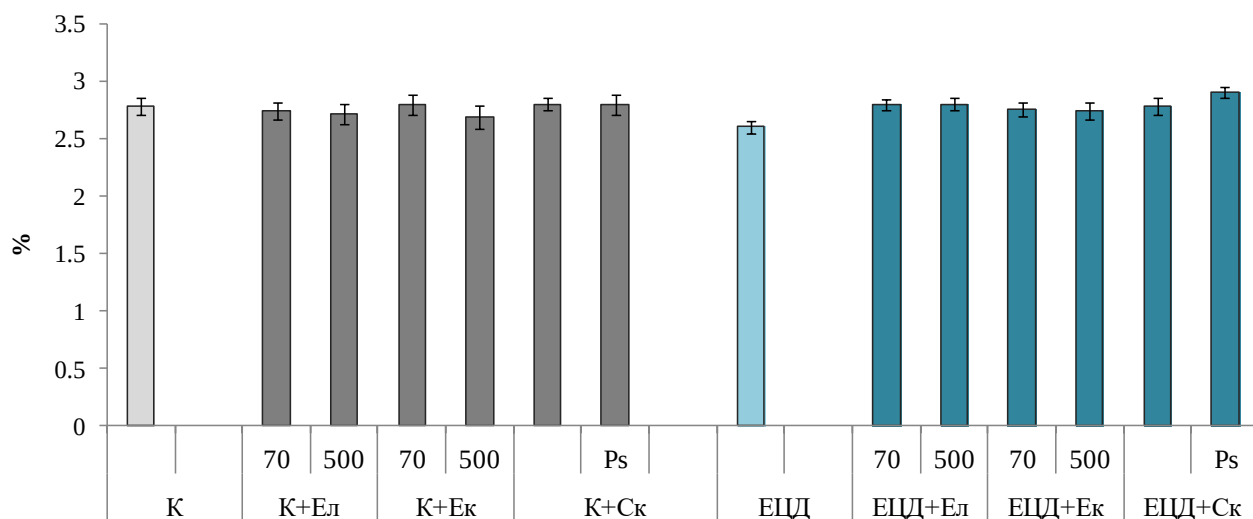


Рис. 3.42. Зміни СЦК реакції на вміст неензимних лізосомальних катіонних протеїнів нейтрофілів за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Продемонстровано незначне збільшення СЦК мієлопероксидази у нейтрофілах при ЦД. Активність мієлопероксидази характеризує кисень-залежний механізм бактерицидної дії нейтрофільних гранулоцитів. Введення екстракту листя тваринам з ЕЦД зумовлювало незначне зниження СЦК мієлопероксидази на 9,8 % (Ел⁷⁰) і 8,5 % (Ел⁵⁰⁰), екстракту корневих бульб – на

5,2 % (Ек⁷⁰) і 7,2 % (Ек⁵⁰⁰), нестабілізованої і стабілізованої суспензій відповідно на 7,8 % і 9,8 %. Ці результати підтверджують нормалізуючий ефект досліджуваних субстанцій *S. sonchifolius* на активність мієлопероксидази за СЦК (рис. 3.43).

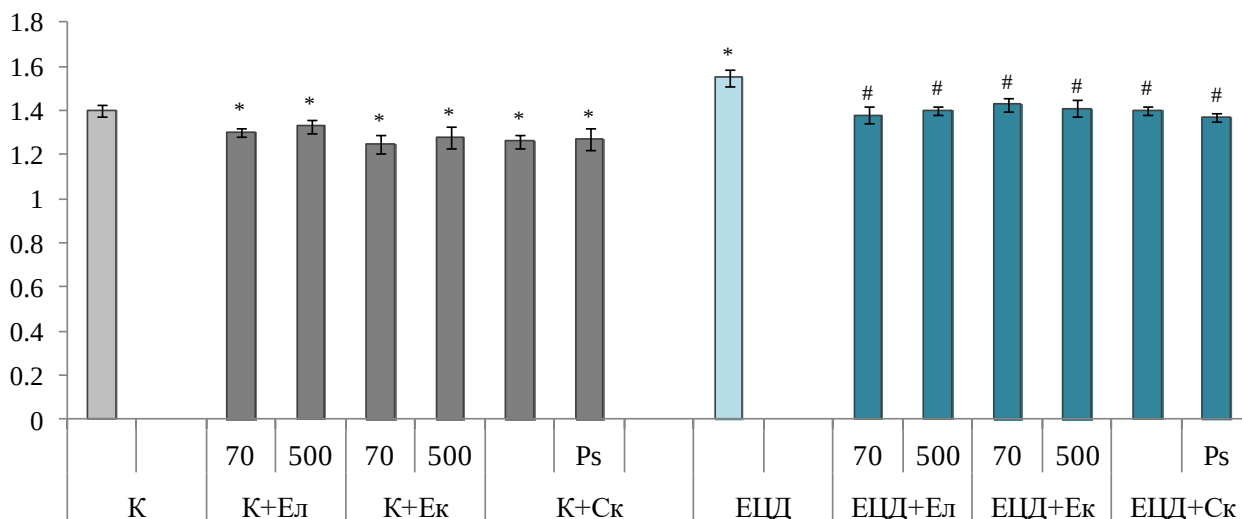


Рис. 3.43. Зміни СЦК мієлопероксидази за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Розвиток ЕЦД супроводжувався збільшенням кількості клітин, з позитивною реакцією на вміст МПО, про що свідчить зростання СЦК на 16,4 % порівняно з контролем. Застосування безкалоїдного екстракту *G. officinalis* сприяло зниженню СЦК мієлопероксидази на 12,9 % у тварин хворих на ЦД до значень фізіологічної норми (рис. 3.44).

За умов ЦД не відмічено змін кисневонезалежних механізмів загибелі мікроорганізмів, які опосередковані участю катіонних протеїнів. Встановлено зниження СЦК катіонних протеїнів на 34,3 % у хворих на діабет тварин, яким вводили безкалоїдний екстракт *G. officinalis*, порівняно з діабетом. Подібним чином впливав екстракт і на здорові тварини, зумовлюючи зниження СЦК реакції на вміст катіонних протеїнів на 42,6 %, порівняно з контролем (див. рис. 3.44). Ці результати можна пояснити наявністю у складі безкалоїдного

екстракту *G. officinalis* флавоноїдів, які, як вказано в літературі, пригнічують секрецію катіонних протеїнів (Middleton, Jr., M.D., 1996).

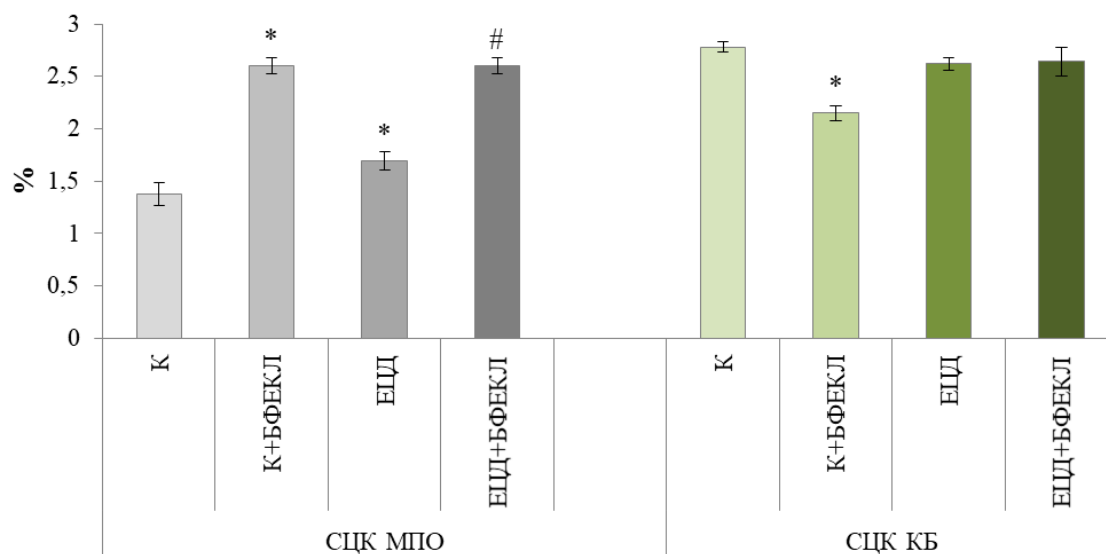


Рис. 3.44. Зміни СЦК мієлопероксидази та катіонних протеїнів у нейтрофілах здорових та хворих на ЦД тварин, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Таким чином, вираженіші зміни активності мієлопероксидази у нейтрофілах крові порівняно зі змінами вмісту КБ, які зумовлені дегрануляцією нейтрофілів, свідчить про важливу роль кисеньзалежної метаболічної системи нейтрофілів за умов ЕЦД.

Порушення бактерицидних властивостей нейтрофілів за умов ЕЦД підтверджено також за результатами спонтанного та стимульованого НСТ-тесту. За даними НСТ-тесту обчислювали частку активованих нейтрофілів (ЧАН) та індекс активності нейтрофілів (ІАН), які комплексно характеризують кисень-залежний механізм фагоцитозу нейтрофільних гранулоцитів. Показано зниження ЧАН на 13,7 % у тварин з ЕЦД, що свідчить про зниження функціонального резерву нейтрофілів (рис. 3.45).

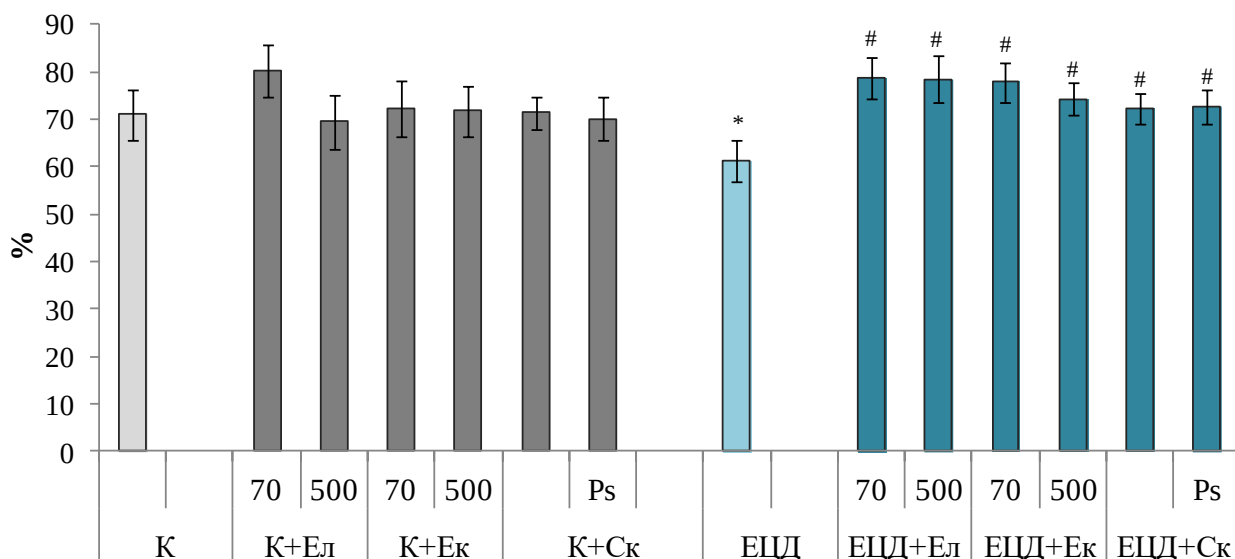


Рис. 3.45. Частка активованих нейтрофілів периферичної крові щурів (спонтанний НСТ-тест) за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Введення водних екстрактів та суспензій *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД сприяло зростанню ЧАН на 26,4 % (ЕЦД+Ел⁷⁰), 25,5 % (ЕЦД +Ел⁵⁰⁰), 23,5 % (ЕЦД+Ек⁷⁰), 18,5 % (ЕЦД+Ек⁵⁰⁰), 15,1 % (ЕЦД+Ск) та 15,9 % (ЕЦД+Ск^{Ps}), порівняно з показниками діабетичних тварин (див. рис. 3.45).

ІАН, що характеризує інтенсивність вільнорадикальних процесів й поглинальну здатність фагоцитуючих клітин, знижувався на 29,1 % у діабетичних тварин, порівняно з контрольними (рис. 3.46). Ці результати узгоджуються з літературними даними, які підтверджують зниження бактерицидної активності нейтрофілів у разі діабету, а також зниження кількості активно фагоцитуючих клітин та секреції лізосомальних ензимів (Oliveira et al., 2013). При введенні тваринам з ЕЦД *S. sonchifolius* у всіх досліджуваних формах відмічено зростання ІАН, порівняно з діабетом. У контрольних тварин лише введення екстракту листя зумовлювало зростання ІАН (на 20,9 %), щодо контролю (рис. 3.46).

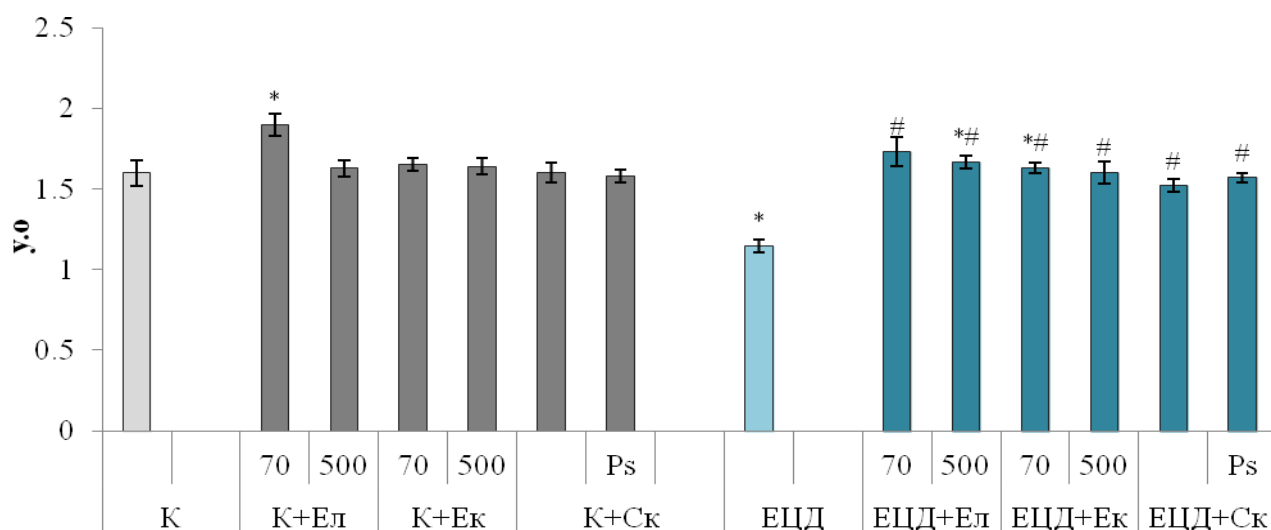


Рис. 3.46. Індекс активності нейтрофілів периферичної крові щурів (спонтанний НСТ-тест) за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*. * - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Для оцінки потенційної здатності клітин активувати їхню цитотоксичну функцію у відповідь на додатковий стимул проводили стимульований НСТ-тест. Встановлено зниження ЧАН на 15,2 % та ІАН на 16,3 % при стимуляції нейтрофілів тварин хворих на діабет, порівняно з контролем (рис. 3.47).

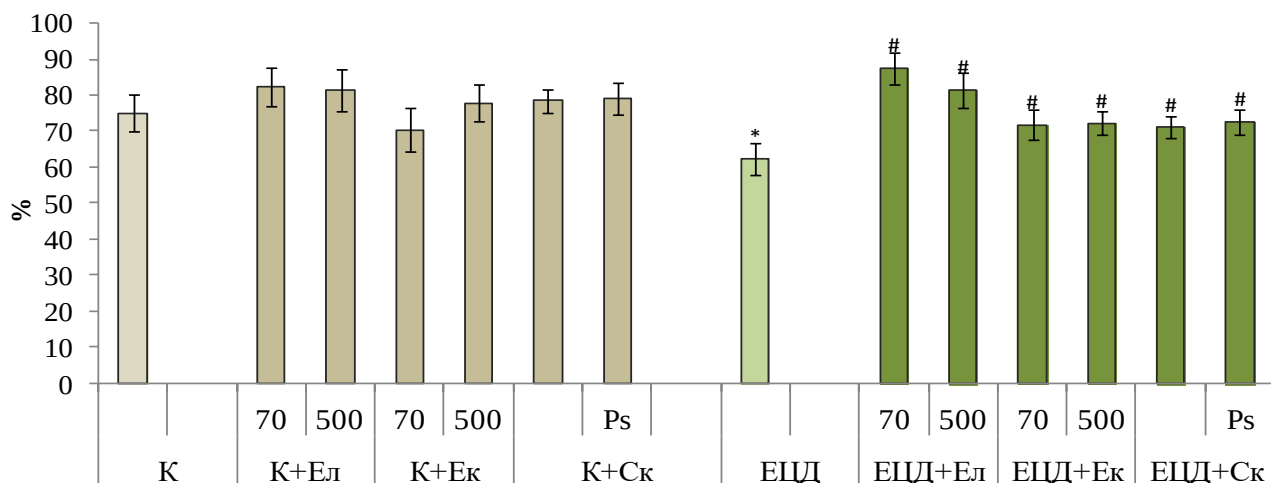


Рис. 3.47. Частка активованих нейтрофілів периферичної крові щурів (стимульований НСТ-тест) з ЕЦД та при введенні водних екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*. * - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Отримані результати можна розцінювати як ознаку слабкої стимуляції нейтрофілів та порушення метаболічних процесів, які забезпечують “кисневий вибух” – найважливіший механізм протимікробного захисту та елімінації патогенів. Зниження показників НСТ-тесту в умовах стимуляції нейтрофілів свідчить про незадовільний стан бактерицидної системи клітин, що може бути причиною хронічних запальних процесів, які притаманні ЦД.

У тварин з ЕЦД відмічено зростання ЧАН, при застосуванні екстракту листя на 36,8 % (Ел⁷⁰) і 34,9 % (Ел⁵⁰⁰), екстракту кореневих бульб на 12,6 % (Ек⁷⁰) і 13,9 % (Ек⁵⁰⁰) та нестабілізованої на 11,9 % і стабілізованої суспензії на 13,2 %. Також досліджувані екстракти та суспензії *S. sonchifolius* зумовлюють зростання ІАН при ЕЦД: екстракт листя на 27,1 % (Ел⁷⁰) і 27,9 % (Ел⁵⁰⁰), екстракт кореневих бульб на 14,3 % (Ек⁷⁰) і 15,5 % (Ек⁵⁰⁰) та нестабілізована суспензія на 15,9 % і стабілізована суспензія на 16,3 %. У контрольних тварин лише екстракти листя зумовлюють зростання ІАН (рис. 3.48).

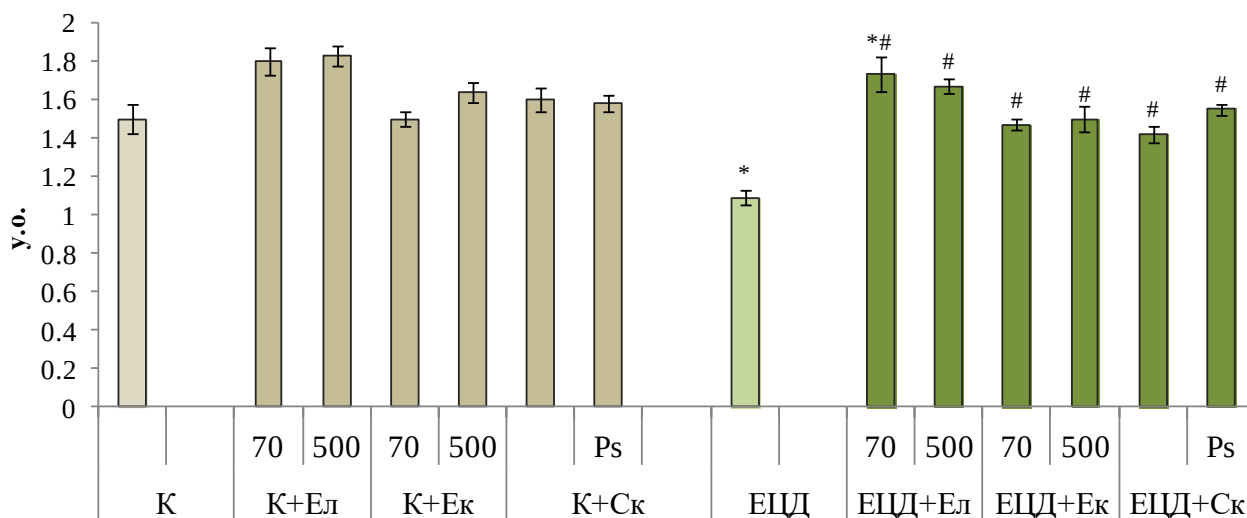


Рис. 3.48. Індекс активності нейтрофілів периферичної крові щурів (стимульований НСТ-тест) за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій *S. sonchifolius*. * - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Варто зауважити, що екстракти листя та коренів *S. sonchifolius* в обох досліджуваних дозах однаковою мірою впливають показники, які характеризують функціональний стан нейтрофілів.

Аналіз літературних даних дає підстави вважати, що 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 імуномодуючою дією (Baroni et al., 2008; Oliveira et al., 2013).

3.6.3. Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* регулює проліферацію лейкоцитів за умов ЕЦД

Високий рівень глюкози у крові спричиняє розвиток запального процесу, на що в першу чергу реагують лейкоцити. Реакція організму на розвиток запального процесу проявляється у стимуляції кровотворення, виході лейкоцитів з резервного пулу кісткового мозку у кров та міграції лейкоцитів з крові у вогнище запалення. Процеси проліферації кісткомозкових попередників лейкоцитів за умов ЦД на сьогоднішній день вивчені недостатньо. Відтак, на наступному етапі роботи нами було проліферативну активність кісткомозкових попередників лейкоцитів.

За включенням у проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксидуридину було встановлено, що за умов ЕЦД відбувається значне підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у S-фазі мітотичного циклу. При цьому, рівень включення в проліферуючі клітини 5-бром-2'-дезоксидуридину був вищим у 3,9 разів, порівняно з контролем. Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам контрольної групи не призводило до статистично вірогідних змін досліджуваного показника, тоді як у тварин з ЕЦД його рівень знижувався у 2,8 рази (рис. 3.49).

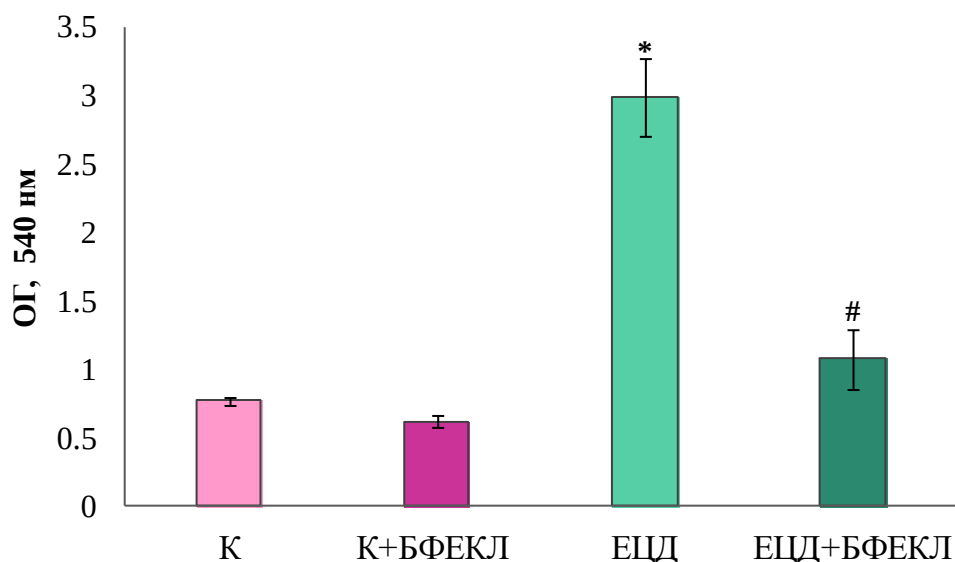


Рис. 3.49. Рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксидуридину при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам, хворим на ЦД

Для підтвердження коригуючого впливу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на процеси проліферації та диференціації попередників лейкоцитів периферичної крові щурів на клітинному рівні нами було проведено цитологічні дослідження клітин білого ростка кісткового мозку. Проведені дослідження показали збільшення кількості попередників лімфоцитів (на 44 %) за умов ЕЦД, проте кількість лімфоцитів у кістковому мозку істотно не змінювалася.

Крім того, встановлено зменшення кількості мієлобластів на 31 %, що спричинило зниження кількості юних та поліморфноядерних нейтрофілів (ПЯН) на 31% (табл. 3.23). Отримані дані вказують на прискорену елімінацію у периферичну кров або сповільнене дозріванням цих клітин. Перш за все, це може бути пов'язано або зі змінами співвідношення медіаторів, які стимулюють диференціювання клітин-попередників у спеціалізовані зрілі нейтрофіли, або змінами фенотипу мієлоїдних клітин (завдяки зменшенню експонування рецепторів до цих медіаторів) (Alnek et al., 2015; J. Chen et al., 2006; A. Y. Lee et al., 2003).

Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам хворим на ЦД зумовлювало зниження кількості лімфобластів на 18,6 % та збільшення кількості лімфоцитів на 31,1 %. Також було відмічено зниження кількості сегментно-ядерних нейтрофілів (СЯН) на 39,1 % та тенденцію до підвищення вмісту ювенільних та поліморфноядерних нейтрофілів на 20,3 % порівняно з ЕЦД. У здорових тварин, яким вводили досліджуваний екстракт знижувалася кількість юних, поліморфноядерних (на 11,4 %) та сегментно-ядерних нейтрофілів (на 64,6 %), порівняно з контролем (табл. 3.23).

Таблиця. 3.23

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
<i>Мієлоїдний ряд</i>				
Мієлобласти	1,91±0,15	0,84±0,09*	1,46±0,12	1,26±0,09
Метамієлоцити	18,54±1,21	13,53±0,89	12,78±1,39*	12,42±1,17
Юні та ПЯН	15,67±1,38	13,89±0,28	10,84±1,86*	13,04±0,83
СЯН	1,58±0,14	0,56±0,07*	1,10±0,15	0,67±0,009 [#]
Базофіли зрілі	0,19±0,12	0,11±0,08	0,44±0,05	-
Еозинофіли зрілі	0,40±0,06	0,37±0,19	0,32±0,08	0,41±0,13
<i>Лімфоїдний ряд</i>				
Лімфобласти	34,31±1,74	38,56±2,07	49,48±2,67*	40,26±1,94 [#]
Лімфоцити	27,40±1,03	32,13±2,85	23,60±2,36	30,95±1,81 [#]

Примітка: ПЯН – поліморфноядерні нейтрофіли; СЯН – сегментноядерні нейтрофіли

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Процеси проліферації та диференціації клітин імунної системи безпосередньо залежать від стану окисно-відновного потенціалу гемопоетичних клітин (Oliveira et al., 2013). Редокс-баланс підтримується завдяки підтриманню певного рівня АФО і активності антиоксидантних систем у клітині. Як показали наші дослідження, у клітинах білого ростка кісткового мозку за умов ЕЦД знижується активність ключових ензимів антиоксидантного захисту – СОД (на 40 %), каталази (на 50 %) та ГПО (на 24 %), що супроводжується значним підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів (у 4 рази) (табл. 3.24).

Таблиця 3.24

Маркерні показники оксидативного стресу у клітинах білого ростка кісткового мозку за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту

G. officinalis

Показник	К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
СОД, U/мг протеїну	34,5±2,0	31,1±4,5	20,6±2,1*	23,1±1,3
Каталаза, нмоль H ₂ O ₂ /хв×мг протеїну	6,6±0,4	7,2±0,4	3,3±0,3*	5,9±0,2 [#]
ГПО, мкмоль G-SH/хв×мг протеїну	2,1±0,4	2,1±0,3	1,6±0,1*	2,5±0,3 [#]
ТБК-ПП, нмоль×мг протеїну	1,4±0,1	1,7±0,2	5,7±0,5*	2,9±0,3 [#]

* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; [#] – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P < 0,05

Таким чином, коригуючий ефект екстракту безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на проліферативну активність клітин лімфоїдного та мієлоїдного рядів кісткового мозку може бути опосередкований його впливом на секрецію ТНФ-α та прояви оксидативного стресу.

Висновки до розділу 3.6

Встановлений нами коригуючий ефект впливу безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на функціональний стан лейкоцитів може реалізуватися завдяки перерозподілу кількості і змінам у структурі вуглеводних детермінант поверхневих глікокон'югатів мембран цих клітин та впливу на процеси реорганізації елементів актинового цитоскелету. Дія досліджуваного екстракту на формування елементів цитоскелету за умов ЕЦД на фоні тривалої гіперглікемії може бути опосередкована наявністю у його складі компонентів з підтвердженими гіпоглікемічними та протизапальними властивостями. Ці сполуки здатні пригнічувати процеси неензиматичного глікозилювання, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету, а також впливати на вміст прозапального цитокіну ФНП- α , який регулює локомоторну здатність лейкоцитів.

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 і метаболічну активність нейтрофілів виявляли екстракт та суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius*. Натомість, екстракт отриманий з листя *S. sonchifolius*, не забезпечував корекцію виявлених порушень фагоцитозу за умов діабету, і навіть зумовлював їхнє посилення.

Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* виявляв модулюючий вплив на метаболічну активність нейтрофілів периферичної крові щурів, нормалізуючи

активність МПО, а також коригував порушення процесу кровотворення при цукровому діабеті, індукованому стрептозотоцином, що підтверджувалося зміною показників проліферації та диференціації кістково-мозкових попередників лейкоцитів.

Публікації:

1. Lupak, M., **Hachkova, H.**, Khokhla, M., Chajka, Ya., Skybitska, M., & Sybirna, N. (2017). Leukocyte actin cytoskeleton reorganization and redistribution of sialylated membrane glycoconjugates under experimental diabetes mellitus and against the administration of the *Galega officinalis* L. extract. *Cytology and Genetics*, 51(3), 162–172. <https://doi.org/10.3103/S0095452717030070>.
2. Nagalievskaya, M., Sabadashka, M., **Hachkova, H.**, & Sybirna, N. (2018). *Galega officinalis* extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2079-3>.
3. Mariia Nagalievskaya, M. S., & **Halyna Hachkova**, Nataliia Sybirna. (2019). Functional activities of neutrophils in diabetic rats are changed by yacon extracts. *Clinical Diabetology*, 8(5), 248–253. <https://doi.org/10.5603/DK.2019.0023>.

3.7. Вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на вміст кінцевих продуктів глікації та їхніх рецепторів у лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету

За умов хронічної гіперглікемії посилюються процеси неензиматичного глікозилювання (глікування) (Ruiz, Ramasamy, & Schmidt, 2020). Глікації піддаються біомолекули, у складі яких є вільна аміногрупа. Внаслідок взаємодії редукуючих моносахаридів та активних карбонільних сполук з біомолекулами, у клітині накопичуються кінцеві продукти глікації (Advanced glycation end

products, AGEs), які є адуктами протеїнової, ліпідної або нуклеїнової природи (Jud & Sourij, 2019; Peng et al., 2011). 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, хворих на цукровий діабет вміст AGEs збільшувався на 14 %, порівняно з контролем. При введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* діабетичним тваринам, вміст AGEs незначно знижувався щодо діабету (рис. 3.50).

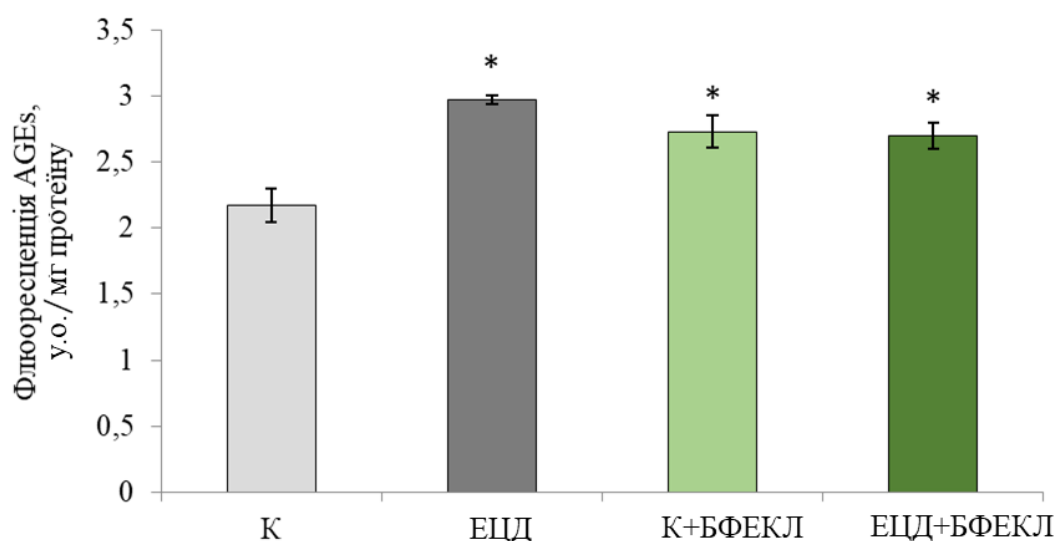


Рис. 3.50. Вміст AGEs у плазмі крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

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 (рис. 3.50-3.51). Зниження рівня AGEs в лейкоцитах на фоні підвищення рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну та AGEs в крові тварин з ЕЦД свідчить про

порушення надходження глюкози в лейкоцити. Клітини крові отримують глюкозу через 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.

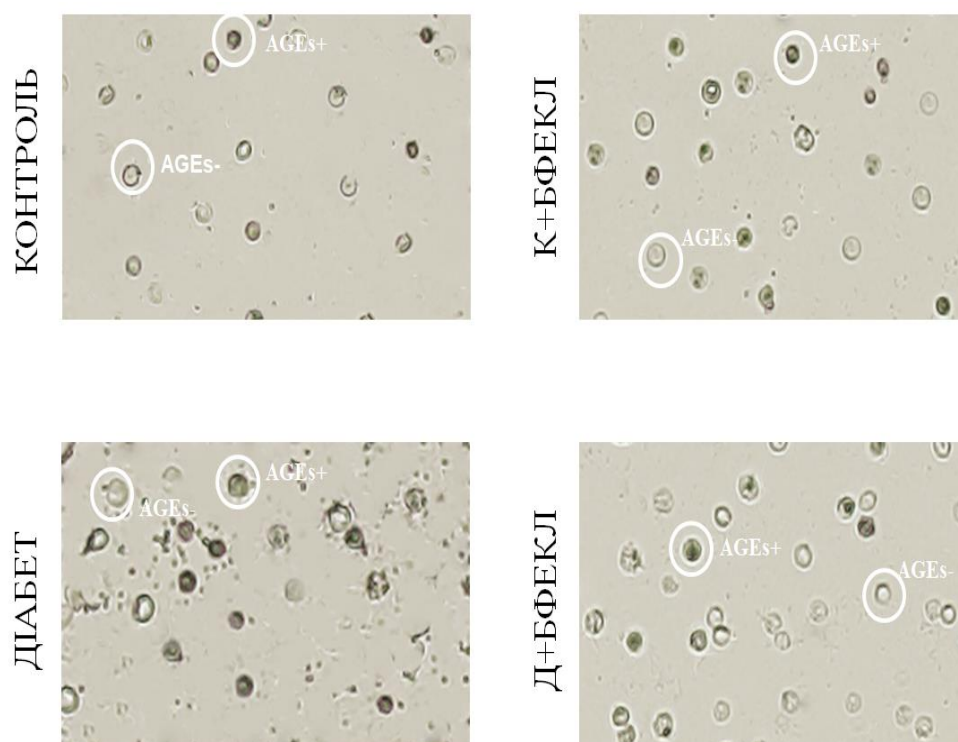


Рис. 3.51. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до AGEs за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД зумовило незначне підвищення кількості клітин із позитивною реакцією на вміст кінцевих продуктів глікації (AGEs⁺), порівняно з діабетом. У тварин контрольної групи, яким вводили рослинний екстракт спостерігали зменшення

кількості AGEs⁺-клітин на 21 % на фоні підвищення кількості AGEs⁻-клітин (рис. 3.51-3.52).

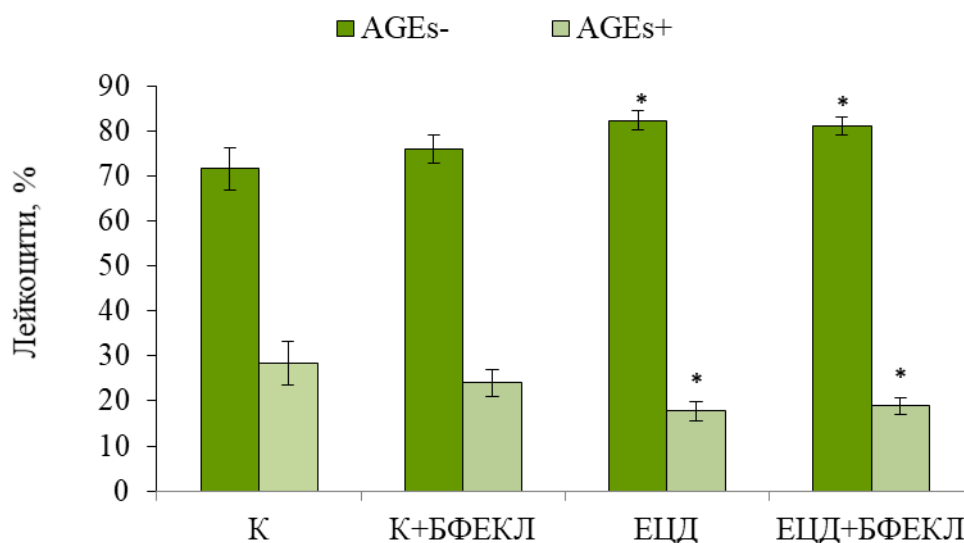


Рис. 3.52. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту в клітинах AGEs за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*. * - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Взаємодія AGE з його головним клітинним рецептором (receptor for advanced glycation end products, RAGEs) активує низку сигнальних шляхів, таких як MAPK / ERK, TGF- β , JNK і NF- κ B, що призводить до утворення АФО та підвищення секреції прозапальних цитокінів та сприяє розвитку діабетичних ускладнень і запалення (Subedi et al., 2020; M. Wang et al., 2012). Водночас, індуковане гіперглікемією утворення АФО зумовлює посилення експресії RAGE (Ighodaro, 2018; Kang & Yang, 2020). Подальші наслідки взаємодії AGEs/RAGE включають порушення трансдукції інсулінового сигналу, зумовлюючи зменшення вмісту на плазматичній мембрані м'язових клітин інсулінзалежних глюкозних транспортерів GLUT4 (Jasmin et al., 2019; Maratou et al., 2007), а також порушення метаболічного гомеостазу, індуковану RAGE

токсичність бета-клітин підшлункової залози та епігенетичні модифікації. (Khalid et al., 2022).

Підвищення вмісту AGEs у плазмі крові щурів зумовлювало зростання вмісту RAGEs експонованих на мембранах лейкоцитів. Проведений імуноцитохімічний аналіз підтвердив збільшення кількості рецепторів до кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов стрептозотоцин-індукованого ЦД, про це свідчить підвищення чисельності RAGEs⁺-клітин у 1,2 рази порівняно з контролем (рис. 3.51-3.54).

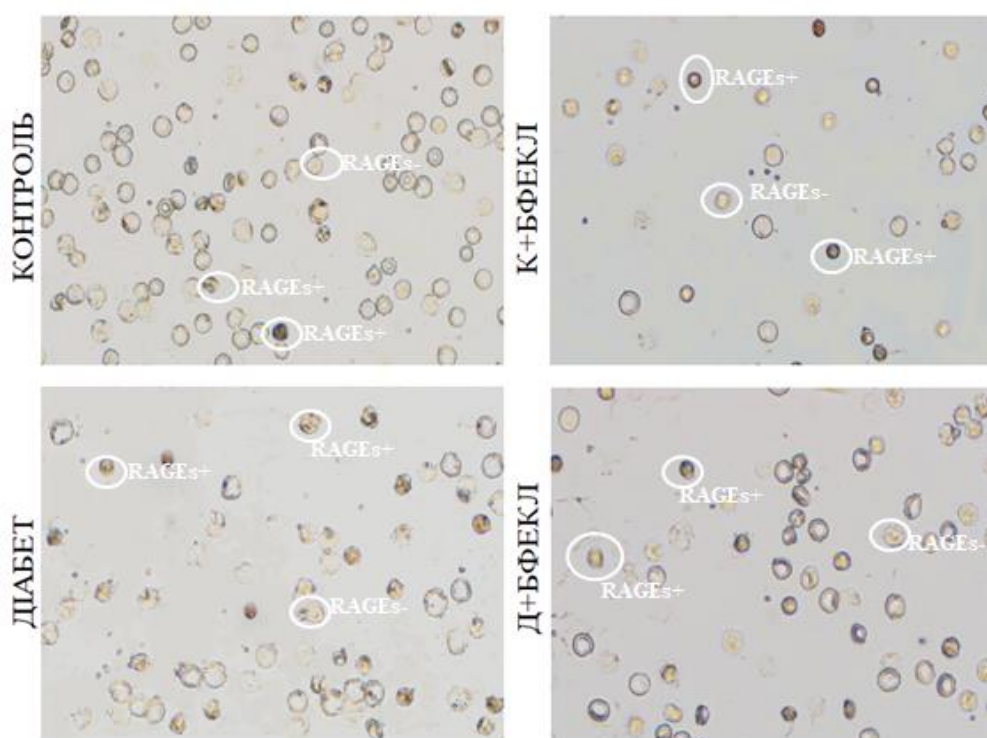


Рис 3.53. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до білка RAGE за умов ЕЦД при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД зумовило зниження кількості RAGEs⁺-лейкоцитів на 37 % порівняно з діабетом. Ці дані узгоджуються з результатами, які відображають зміни вмісту AGEs у плазмі крові за впливу досліджуваного екстракту. У тварин контрольної групи, яким вводили екстракт *G. officinalis* спостерігається зменшення кількості

RAGEs⁺-клітин на 25 %, на фоні підвищення кількості лейкоцитів з негативною реакцією на вміст рецепторів до кінцевих продуктів глікації (рис. 3.51-3.54).

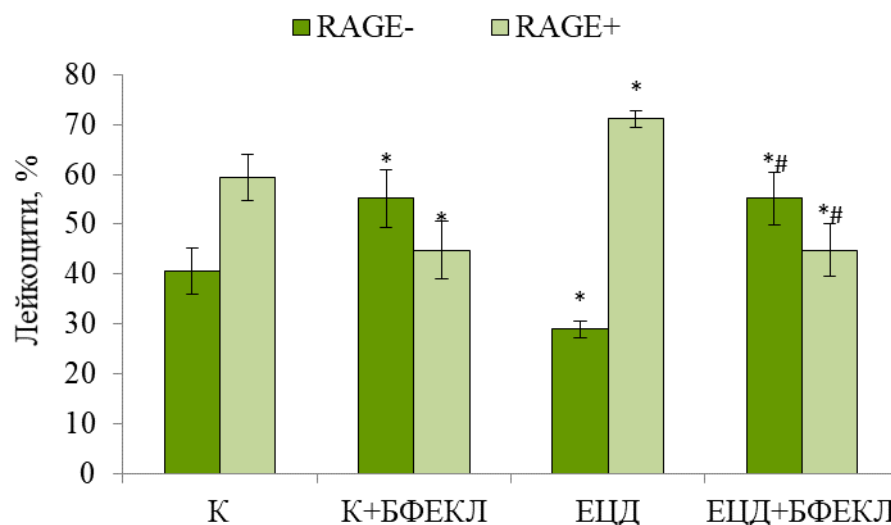


Рис. 3.54. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту в клітинах RAGEs за умов ЕЦД при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*. * - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Підсумок до розділу

Встановлено зниження вмісту кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах за умов ЕЦД. Отримані дані свідчать про можливе порушення поглинання глюкози лейкоцитами при досліджуваній патології. Водночас показано підвищення експонування на мембранах лейкоцитів рецепторів до кінцевих продуктів глікації у відповідь на підвищений вміст AGEs у плазмі крові за досліджуваної патології. Ми припускаємо, що здатність безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* знижувати вміст рецепторів до кінцевих продуктів глікації на мембранах імунокомпетентних клітин у тварин хворих на діабет, зумовлено наявністю у його складі біологічно активних речовин з гіпоглікемічною дією.

Публікації:

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). DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1504.672>.

3.8. Вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, а також водних екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* на апоптоз лейкоцитів периферичної крові щурів за умов ЕЦД

Хронічна гіперглікемія призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу, в ході якого утворюються продукти, що виявляють потужну проапоптотичну дію. Тому на наступним етапом роботи було дослідження впливу біологічно активних речовин виділених з *G. officinalis* та *S. sonchifolius* на процес апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів. Ключову роль у запуску програми апоптозу відіграє співвідношення індукторів та репресорів цього процесу у клітині, а саме, протеїнів p53 та Bcl-2.

Посилена продукція АФО та АФН за умов гіперглікемії призводить до незворотнього інгібування дихального ланцюга, деполяризації мітохондріальної мембрани, вивільнення цитохрому с в цитозоль (пов'язане або з втратою мембранного потенціалу мітохондріями, або завдяки нітрозилуванню залишку тирозину цитохрому с), нітрозилування низки мітохондріальних протеїнів (Carreras & Poderoso, 2007; Danylovych et al., 2018; Davidson & Duchon, 2006; Elfering et al., 2004). Як наслідок виникає колапс мітохондріальної енергетики та розвивається апоптоз.

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. Проведені нами дослідження показали підвищення кількості лейкоцитів з позитивною та різко позитивною реакцією на вміст проапоптотичного протеїну p53, відповідно на 18 % та 268 % у діабетичних тварин та зменшення кількості клітин з негативною реакцією на вміст білка цього протеїну на 21 %, порівняно з контрольними тваринами (рис. 3.55).

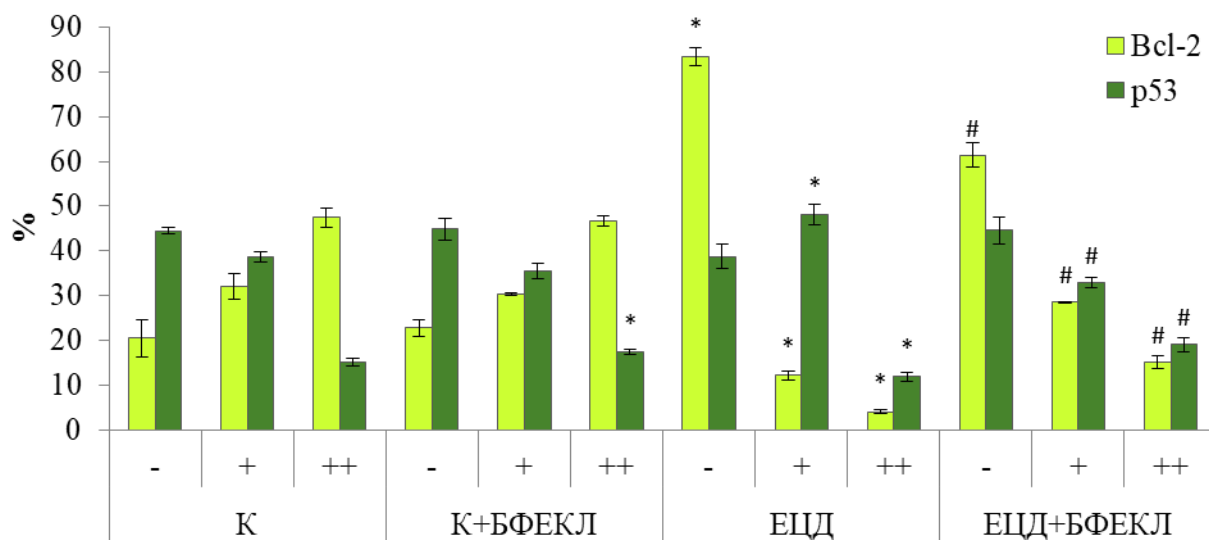


Рис. 3.55 Співвідношення (%) лейкоцитів периферичної крові, які відрізняються за вмістом протеїнів p53 та Bcl-2 за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Ці дані вказують на інтенсифікацію апоптозу за умов ЦД та узгоджуються з дослідженнями інших авторів. На мишах лінії Nod було показано, що гіперглікемія індукує розвиток p53-опосередкованого апоптозу (Jazayeri et al., 2008; Mihara et al., 2003), а у хворих на ЦД 1 типу в сироватці крові виявляються анти-p53-аутоантитіла та збільшується інтенсивність p53-індукованого апоптозу (Keim et al., 2001).

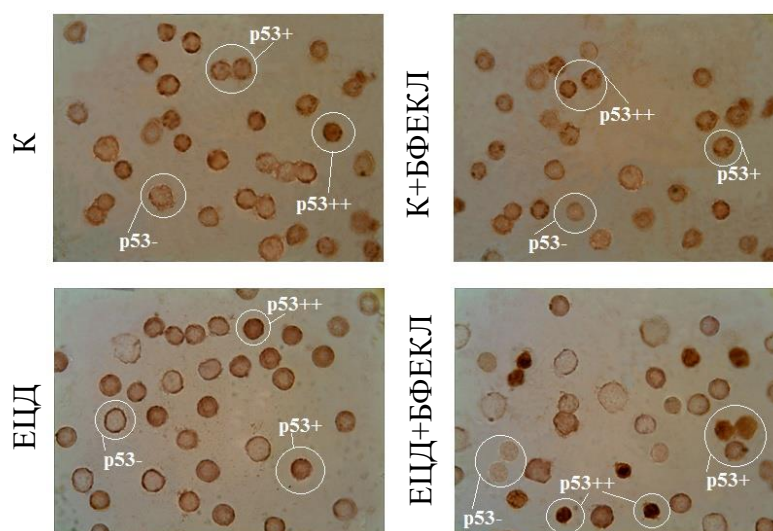


Рис. 3.56. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до протеїну p53 за умов введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД

Водночас, було встановлено збільшення кількості Bcl-2⁺- та Bcl-2⁺⁺-лейкоцитів, відповідно на 23 % та 143 % і зниження кількості Bcl-2⁻-клітин на 16 % за умов ЕЦД (рис. 3.55-3.57). Отримані результати свідчать про збільшення кількості клітин, що містять протеїни-регулятори апоптозу з протилежними функціями – проапоптичного білка p53 і антиапоптичного Bcl-2.

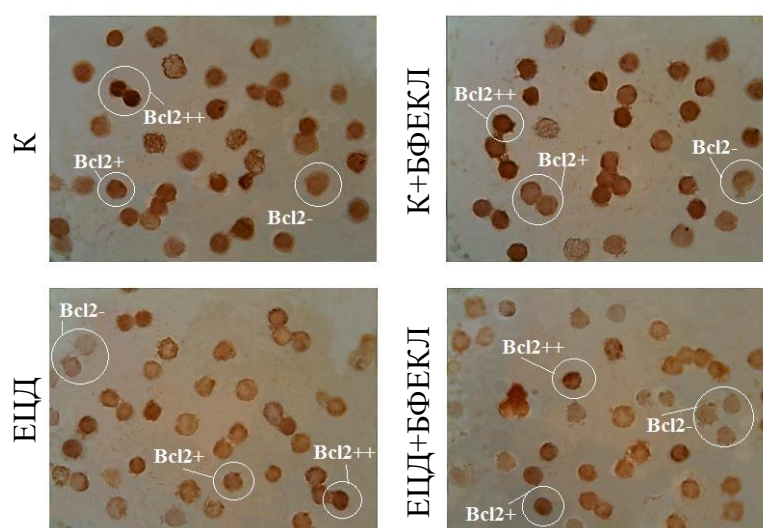


Рис. 3.57. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до протеїну Bcl-2 за умов введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД

У лейкоцитах тварин контрольної групи, яким вводили безалкалоїдний екстракту *G. officinalis* не відмічено статистично вірогідних змін вмісту протеїнів p53 і Bcl-2 (рис. 3.55). Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД призводило до вірогідного зниження кількості p53⁺-клітин на 32 % та p53⁺⁺-клітин на 69 %, порівняно з діабетом, що майже відповідає контрольним значенням. Водночас показано зниження кількості Bcl-2⁺ (на 12 %) та Bcl-2⁺⁺ (на 59 %) клітин до значень фізіологічної норми (рис. 3.55). Отримані дані дають підстави зробити висновок про коригуючий вплив БАР безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на вміст протеїнів p53 та Bcl-2 у лейкоцитах периферичної крові діабетичних щурів.

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 білка p53 та посилення апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові (рис. 3.58).

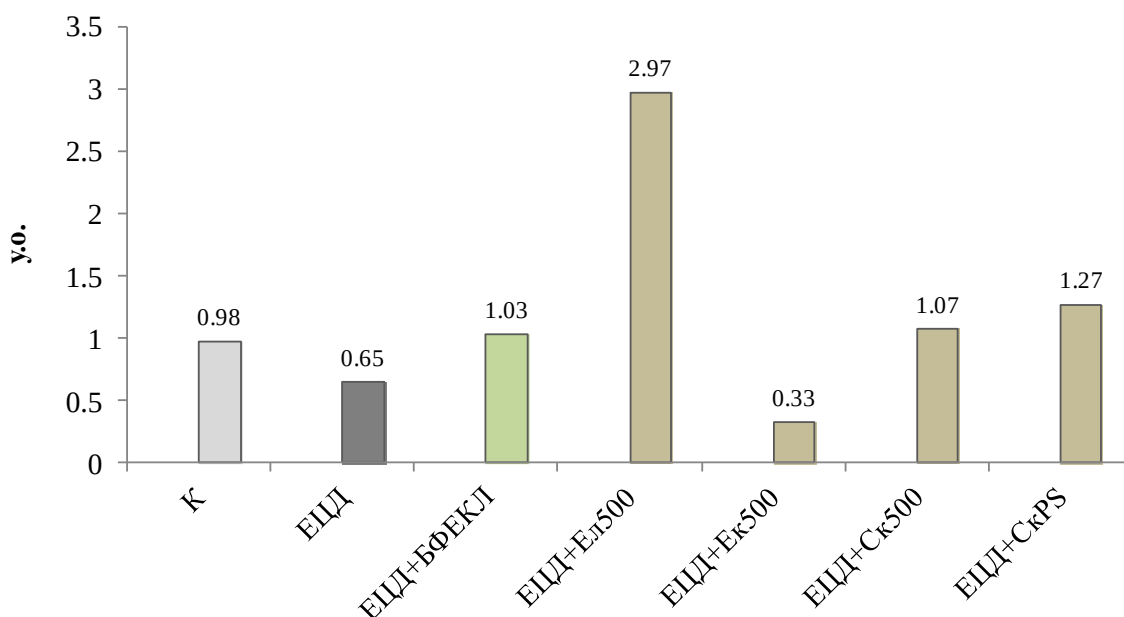


Рис. 3.58. Співвідношення вмісту протеїнів-регуляторів апоптозу Bcl-2⁺⁺/p53⁺⁺ у лейкоцитах за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, а також екстрактів і суспензій *S. sonchifolius*

За умов ЕЦД, на тлі зростання вмісту протеїну p53 у лейкоцитах встановлено підвищення вмісту фрагментованої ДНК у 2,4 рази, щодо контролю. Введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* зумовлювало пригнічення фрагментації ДНК у діабетичних тварин на 39,1 % (рис. 3.58).

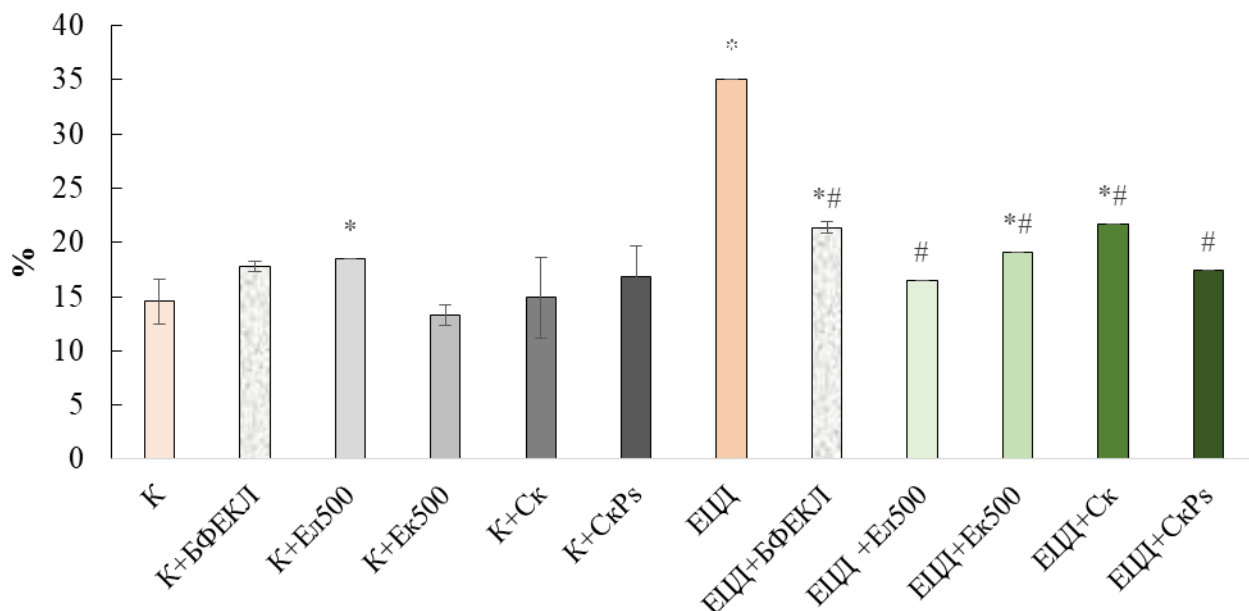


Рис. 3.58. Вміст фрагментованої ДНК у лейкоцитах за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* та екстрактів і суспензій *S. sonchifolius*.

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

У разі введення водного екстракту листя *S. sonchifolius* тваринам з ЕЦД встановлено зниження кількості p53⁺- та p53⁺⁺-лейкоцитів на 12 % та 69 % відповідно та збільшення кількості Bcl-2⁺⁺-клітин на 40 % (табл. 3.25), а також зниження вмісту фрагментованої ДНК на 53 % (рис. 3.58), порівняно з діабетом. Співвідношення Bcl-2⁺⁺/p53⁺⁺ у лейкоцитах є істотно вищим, порівняно з діабетом, що свідчить про пригнічення апоптичних процесів у цих клітинах. Натомість, введення екстракту *G. officinalis* нормалізувало співвідношення досліджуваних протеїнів-регуляторів апоптозу (рис. 3.57).

В результаті застосування суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* та її стабілізованої форми за умов ЕЦД встановлено зниження вмісту фрагментованої ДНК у лейкоцитах (на 38 % та 50 % відповідно) та нормалізацію вмісту досліджуваних протеїнів-регуляторів апоптозу (табл. 3.25, рис. 3.57). Незважаючи на подібний характер змін вмісту протеїнів Bcl-2 та p53 при введенні суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius*, показник співвідношення Bcl-2⁺⁺/p53⁺⁺ підтверджує стрімкіше зростання вмісту Bcl-2, тобто про антиапоптичний коригувальний ефект досліджуваних чинників за умов ЕЦД (табл. 3.25-3.26, рис. 3.52).

Таблиця 3.25

Співвідношення (%) лейкоцитів периферичної крові, які відрізняються за вмістом протеїну Bcl-2 за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій

S. sonchifolius

Умови експерименту	Bcl-2 ⁻	Bcl-2 ⁺	Bcl-2 ⁺⁺
К	62,66±2,39	35,9±2,19	1,45±0,13
К+ЕЛ ⁵⁰⁰	58,66±1,99*	39,67±2,71	1,67±0,18*
К+ЕК ⁵⁰⁰	58,81±1,81*	40,46±2,73	0,73±0,04*
К+Ск	58,06±2,23*	40,19±2,3	1,75±0,24*
К+Ск ^{Ps}	60,36±3,14	38,09±2,4	1,55±0,22
ЕЦД	52,38±2,59*	44,11±2,34*	3,52±0,36*
ЕЦД+ЕЛ ⁵⁰⁰	55,12±2,99*	39,95±1,83*	4,93±0,54*#
ЕЦД+ЕК ⁵⁰⁰	59,51±1,94*#	38,28±2,33#	2,21±0,27*#
ЕЦД+Ск	57,31±3,61*#	40,9±2,21*#	1,79±0,29*#
ЕЦД+Ск ^{Ps}	60,73±4,89#	37,61±2,55#	1,66±0,29*#

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05

Таблиця 3.26

Співвідношення (%) лейкоцитів периферичної крові, які відрізняються за вмістом протеїну p53 за умов ЕЦД та при введенні екстрактів та суспензій

S. sonchifolius

Умови експерименту	p53 ⁻	p53 ⁺	p53 ⁺⁺
К	56,03±2,98	42,5±3,09	1,47±0,12
К+ЕЛ ⁵⁰⁰	54,03±2,98	44,1±2,09	1,87±0,12*
К+ЕК ⁵⁰⁰	55,88±5,92	42,51±1,46	1,61±0,25
К+СК	55,9±2,93	41,96±2,47	1,47±0,12
К+СК ^{Ps}	57,08±1,86	41,31±1,98	1,61±0,62
ЕЦД	44,35±2,39*	50,22±2,83*	5,42±0,36*
ЕЦД+ЕЛ ⁵⁰⁰	54,58±4,86 [#]	43,76±1,95 [#]	1,66±0,49 [#]
ЕЦД+ЕК ⁵⁰⁰	43,32±1,16*	50,04±2,89*	6,64±0,34* [#]
ЕЦД+СК	50,96±1,47 [#]	47,36±2,24	1,68±0,28 [#]
ЕЦД+СК ^{Ps}	58,67±3,11 [#]	40,02±2,39 [#]	1,31±0,12 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Детекцію ранніх проявів апоптозу лейкоцитів проводили за ступенем експонування фосфатидилсерину на зовнішньому боці плазматичної мембрани.

Застосування подвійного флуоресцентного фарбування клітин анексином V, міченим флюоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC) та пропідій йодидом (PI) 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 (табл. 3.27, рис 3.59).

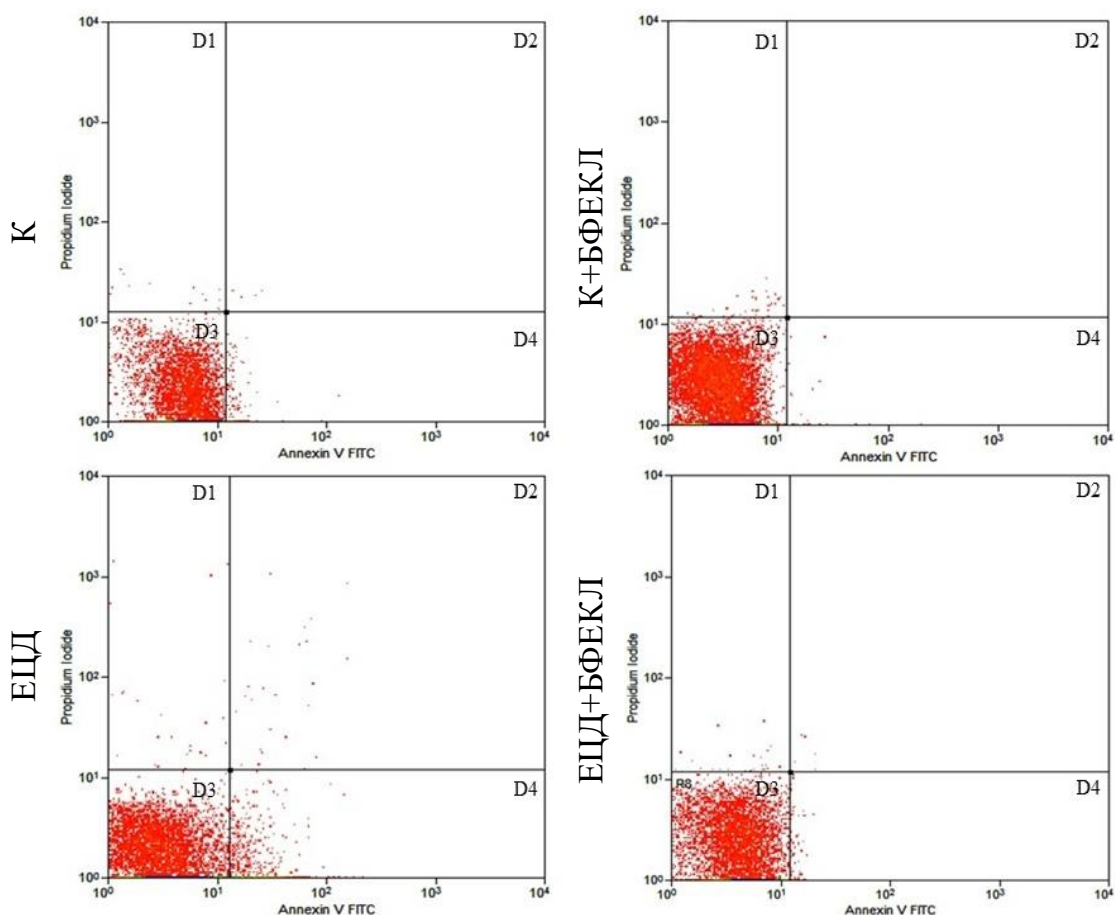


Рис. 3.59. Двовимірні точкові гістограми розподілу апоптотичних і життєздатних клітин в режимі DotPlot (по осі абсцис – інтенсивність флюоресценції анексину V-FITC, по осі ординат – інтенсивність флюоресценції PI). D3 (Анексин V⁻/PI⁻) – живі клітини; D4 (Анексин V⁺/PI⁻) – клітини з ранніми ознаками апоптозу; D2 (Анексин V⁺/PI⁺) – клітини з пізніми ознаками апоптозу; D1 (Анексин V⁻/PI⁺) – клітини на стадії некрозу

Дослідження апоптозу лейкоцитів при ЕЦД методом проточної 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 (табл. 3.27). 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, що майже відповідає контрольним значенням (табл. 3.27).

Таблиця 3.27

Кількість клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу за умов ЕЦД та при введенні безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*

	АнексинV ⁻ / ПЙ ⁻	АнексинV ⁺ / ПЙ ⁻	АнексинV ⁺ / ПЙ ⁺	АнексинV ⁻ / ПЙ ⁺
К	96,41±1,7	2,75±1,92	0,06±0,02	0,78±0,30
К+БФЕКЛ	99,51±0,07	0,11±0,04*	0,004±0,002*	0,38±0,06*
ЕЦД	87,56±1,12*	10,38±0,58*	0,16±0,07*	1,90±1,76
ЕЦД+БФЕКЛ	98,12±0,26 [#]	1,39±0,31 [#]	0,04 ± 0,02 [#]	0,44±0,07 [#]

* - різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # - різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Підсумок до розділу

Виявлений дисбаланс кількісного співвідношення протеїнів-регуляторів апоптозу, підвищення вмісту фрагментованої ДНК та збільшення кількості лейкоцитів з ознаками апоптозу є ознаками посилення апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД. Безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, а також екстракти та суспензії *S. sonchifolius* проявляють пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель лейкоцитів за умов ЦД. Хронічна гіперглікемія призводить розвитку оксидативно-нітративного стресу, в ході якого утворюються продукти, що виявляють потужну проапоптотичну дію. Таким чином, цілком очевидно, що встановлений біологічний ефект досліджуваних екстрактів може бути пов'язаний з наявністю

у їхньому складі біологічно активних речовин з гіпоглікемічною та антиоксидантною дією. Численними експериментальними дослідженнями підтверджено захисний ефект антиоксидантів у процесі апоптозу (Briehl et al., 1995; Kahl et al., 2004; Malorni et al., 1996)

Найвираженіший пригнічувальний вплив на процес апоптозу за умов ЕЦД виявляли безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, а також водний екстракт листя та стабілізована суспензія кореневих бульб *S. sonchifolius*. Антиапоптична дія досліджуваних екстрактів і суспензій може бути зумовлена наявністю в їхньому складі поліфенолів (протокатехова, хлорогенова, кавова, розмаринова кислоти) та їхніх похідних, а також незамінної амінокислоти – триптофану, які виявляють антиоксидантні властивості (Park J.S. et al., 2009; Yan X. et al., 1999).

Публікації:

1. 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. Сибірна // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2012. – Вип. 60. – С. 117–125. (Фахове видання України, категорія Б).
2. 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. http://nbuv.gov.ua/UJRN/ubfj_2013_4_63
3. 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. DOI:10.12923/j.2084-980X/26.4/a.09

4. Nagalievskia M. *Galega officinalis* extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes / Nagalievskia M., Sabadashka M., **Hachkova H.**, Sybirna N. // BMC Complementary and Alternative Medicine. – 2018. – Vol. 18, No. 4. – 13 p. (Scopus; IF – 2,288; Q1). DOI 10.1186/s12906-017-2079-3.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з останніми даними Діабетичного Атласу Міжнародної федерації діабету (IDF) кількість хворих на ЦД 1 та 2 типу серед людей віком від 20 до 79 років становить 537 млн. Експерти прогнозують зростання кількості хворих на ЦД, що становитиме 643 млн до 2030 року і 783 млн до 2045 року (IDF Diabetes Atlas 2021 - 10th edition, www.diabetesatlas.org). В Україні, за різними даними, налічують від 1,5 до 3 млн осіб, хворих на ЦД (Атлас “Діабет в Україні”, 2021).

Причинами глобального зростання кількості хворих на ЦД є старіння населення, посилення негативних тенденцій щодо ожиріння, куріння, надмірне вживання алкогольних напоїв, нездорове харчування та малорухливий спосіб життя або їхнє поєднання (Rasouli et al., 2020)

Значні економічні витрати зумовлені стрімким зростанням поширеності ЦД і передчасною втратою працездатності, а також рання смертність людей унаслідок ускладнень, зумовлюють необхідність ранньої діагностики та інноваційних підходів лікування цього захворювання.

З огляду на багатофакторну етіологію ЦД, лікування цього захворювання вимагає різностороннього розуміння та багатоцільових підходів. Високоефективною терапевтичною стратегією підвищення ефективності лікування ЦД та його ускладнень може слугувати комплексна терапія, яка поєднує синтетичні пероральні антидіабетичні препарати та фітопрепарати. Традиційно, біологічно активні речовини лікарських рослин розглядалися як цінні джерела природних засобів для лікування багатьох захворювань людини, і зокрема, ЦД (Rasouli et al., 2020). Завдяки багатокомпонентному складу, біологічно активні речовини лікарських рослин не лише забезпечуватимуть глікемічний контроль, а й протидіятимуть іншим факторам ризику, які виникають при діабеті. Аддитивна дія та синергізм фітокомпонентів

зумовлюють виражений антидіабетичний ефект, який важко відтворити застосовуючи лікарські монопрепарати. Крім того, препарати природного походження викликають значно менше негативних побічних ефектів, порівняно з синтетичними пероральними засобами, що є надзвичайно важливо, зважаючи на хронічний перебіг ЦД. Фітопрепарати добре поєднуються з синтетичними антидіабетичними засобами, посилюючи їхній терапевтичний ефект. Доведено, що доза метформіну зменшується у чотири рази (з 50 до 12,5 мг/кг маси тіла) для досягнення нормоглікемії у щурів з діабетом у поєднанні з рослинною фітохімічною сполукою – феруловою кислотою (10 мг/кг маси тіла) (Prabhakar et al., 2013). Також у дослідженнях *in vitro* (Nankar and Doble, 2015) показано, що дозу піоглітазону можна зменшити втричі (з 3 до 1 мкМ) завдяки застосуванню 1 мкМ елагової кислоти для досягнення того ж стимульованого інсуліном поглинання 2-NBDG в міотрубках L6 (Nankar & Doble, 2017).

Наукові дослідження підтверджують безпечність і ефективність застосування лікарських препаратів природного походження (Ekor, 2014). Філософія «одна хвороба, одна мішень, один препарат» стає дедалі неефективнішою (Aborode et al., 2022; Panossian et al., 2021; Shikov et al., 2018).

Приблизно 25% фармацевтичних препаратів у всьому світі отримують з рослин (Choudhury et al. 2018). Відомо, що близько 800 лікарських рослин може бути використано для лікування ЦД. Експериментального підтверджено антидіабетичний ефект для близько 450 лікарських рослин, але механізм дії описано лише для близько 109 з них (Prabhakar and Doble, 2008). Ринок рослинних лікарських засобів бурхливо розвивається, а докази їхньої ефективності зростають. Тому розуміння ефективності, безпеки та терапевтичного ризику/користі, які пов'язані з використанням комплексу біологічно активних фітокомпонентів, а також стандартизація продукції є актуальною проблемою, що потребує вирішення.

Враховуючи мультифакторність патогенезу та значне поширення ЦД у світі та в Україні, актуальною проблемою є своєчасна діагностика та

удосконалення способів лікування цього захворювання. Значної уваги заслуговують дослідження, які спрямовані на створення антидіабетичних препаратів, які не лише запобігатимуть гіперглікемії, а й нівелюватимуть прояви оксидативно-нітративного стресу та коригуватимуть метаболічні зміни й порушення функціонального стану імунокомпетентних клітин, індуковані ЦД.

При розробці фітопрепаратів чи функціональних харчових продуктів необхідно враховувати те, що на функціональні характеристики фітопродукту та його стабільність впливає розчинність у воді діючих субстанцій. Седиментаційна нестабільність і погана розчинність фітокомпонентів створює певні труднощі при виготовленні препаратів. Одним зі способів вирішення цієї проблеми є введення у рецептуру препарату біосурфактанту, який підсилює розчинність фітокомпонентів. У сучасних лікарських засобах широко використовуються синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР). Проте, вони можуть викликати алергічні реакції та підвищувати токсичність препаратів. Відтак, на даний час зростає комерційний інтерес до ПАР природного походження (біогенні ПАР) (Banat et al., 2010; Pardhi et al., 2022; M. Singh & Shin, 2009). З огляду на екологічну безпечність і високу ефективність, здатність до емульгування, солюбілізації та міцелоутворення біоПАР мають великий потенціал до застосування у фармації (Kiran et al., 2015; Mulligan, 2005; Rodrigues et al., 2006).

На першому етапі роботи нами було розроблено способи отримання стабільних фітопрепаратів на основі безалкалоїдної фракції екстракту *G.officinalis* та порошку корневих бульб *S. sonchifolius* застосовуючи рамноліпідний біокомплекс – продукт біосинтезу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17. (біосурфактант PS-17).

Нами було підібрано оптимальне співвідношення компонентів для утворення стійкої дрібнодисперсної емульсії на основі екстракту *Galega*

officinalis, що становить 3,3 г/л біосурфактанту PS-17. Така емульсія є стійкою і не розшаровується понад 30 діб.

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

Додавання біосурфактанту PS-17 в незначних кількостях до дисперсійного середовища забезпечує утворення сольватних оболонок, що дає змогу отримати суспензію з характеристиками стабільного препарату (Gelfman, M.I., et al., 2008). Інший механізм пов'язують зі здатністю рамноліпідів взаємодіяти з мембранними білками та ліпідами. При цьому вони збільшують гідрофобність клітинної мембрани, посилюючи таким чином прямий контакт між клітинами і поганорозчинним субстратом (Georgiou et al., 1992). Таку суспензію легше вводити через зонд піддослідним тваринам, що забезпечує чітке дотримання певного дозування діючих речовин.

Ефективність фітопрепаратів залежить від властивостей біологічно активних компонентів у їхньому складі. Відтак аналіз фітохімічного складу *G. officinalis* та *S. sonchifolius* має вирішальне значення для розуміння потенційно корисних біологічних механізмів дії компонентів цих рослин.

Методом газової хроматомаспектрометрії було ідентифіковано низку сполук у складі безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* з потенційною гіпоглікемічною (фітол, етиловий естер пальмітинової кислоти, фітостероли – кампестерол і стигмастерол та похідні хіназоліну) (Elmazar et al., 2013; Islam et al., 2018; Y.-M. Lee et al., 2003; Ram et al., 2003; Sarkodie J.A., 2013; Upadhyay et al., 2022), антиоксидатною (фітол, флавоноїди та вітамін E) (Islam et al., 2018; Pietta, 2000) та протизапальною (метиловий естер ліноленової кислоти та α -амірин) дією (Coniglio et al., 2023).

Методом UHPLC-ESI-MS у складі екстракту *G. officinalis* було ідентифіковано 16 сполук фенольної природи. У негативному режимі електроспрей-іонізації у складі екстракту козлятника лікарського 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).

Підтверджено виражену антидіабетичну дію безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на моделі стрептозотозин-індукованого діабету. Аналіз отриманих результатів дає підстави стверджувати, що гіпоглікемічна дія екстракту *G. officinalis* зумовлена посиленням секреції інсуліну та покращенням структурно-функціонального стану острівцевого апарату підшлункової залози, а також підвищенням толерантності до глюкози.

Виявлене нами збільшення кількості острівців Лангерганса на стандартній площі зрізу, їхньої площі, діаметру, об'єму та кількості β-клітин у тварин хворих на ЦД, яким вводили безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* у дозі 1,2 г/кг маси тіла свідчить про протекторну дію досліджуваного екстракту на інкреторний апарат підшлункової залози.

З літератури відомо, що основні шляхи руйнування бета-клітин острівців Лангерганса, зниження синтезу і секреції інсуліну при цукровому діабеті 1-го типу значною мірою залежать від впливу АФО та TNF-α. Зокрема, станом на сьогодні абсолютно чітко відомо, що при ЦД відбувається специфічна органоселективна деструкція бета-клітин. Активовані Т-хелпери продукують інтерлейкін (ІЛ)-2 та γ-інтерферон, за участю яких активуються макрофаги, цитотоксичні Т-лімфоцити та природні клітини-кілери. Ці клітини можуть проявляти цитотоксичний ефект щодо β-клітин острівців підшлункової залози як специфічно – шляхом прямого цитолізу, так і неспецифічно – продукуючи

медіатори запалення (АФО, цитокіни, зокрема, ІЛ-1, γ -інтерферон, TNF- α та інші, що виявляють токсичний вплив на β -клітини) (Flier et al., 1986; Kukreja & Maclaren, 1999; Mandrup-Poulsen et al., 1987). В експериментах *in vivo* та *in vitro* показано, що TNF- α є одним з головних цитокінів, який індукує апоптоз інсулінопродукуючих клітин (Bruun et al., 2009; M. Chen et al., 2005).

Нами було встановлено зниження активності iNOS, та підвищення активності ГПО і вмісту відновлено глутатіону при введенні екстракту *G. officinalis* тваринам з ЕЦД. Виходячи з отриманих результатів, ми можемо зробити висновок про те, що цитопротекторний вплив безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* на β -ендокриноцити реалізується завдяки здатності компонентів, які містяться у його складі запобігати наслідкам оксидативно-нітративного стресу. До того ж, введення досліджуваного екстракту зумовлювало зниження вмісту прозапального цитокіну TNF- α , і як наслідок, зменшувало його цитотоксичну дію на інкреторний апарат підшлункової залози.

Також відомо, що синтез і секреція інсуліну за хронічної гіперглікемії знижується у результаті пошкоджуючого впливу АФО на ключові транскрипційні фактори у підшлунковій залозі – PDX-1 (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*) та MafA (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) (C. Zhang et al., 2005). Відтак, відновлення функціонального стану β -клітин тварин з ЕЦД, про що свідчить зростання вмісту інсуліну та С-пептиду, у разі введення екстракту *G. officinalis* може бути опосередковано коригуючим впливом БАР, які містяться у його складі на систему антиоксидантного захисту.

Той факт, що безалкалоїдний екстракт *G. officinalis* чинить цитопротекторний вплив у концентрації 1,2 г/кг маси тіла (удвічі більший за ту, за якої підтверджена гіпоглікемічна дія) може свідчити про існування й інших механізмів цитопротекторної дії. Оскільки розміри β -клітин у тварин, хворих на діабет, яким вводили екстракт *G. officinalis* були співставимі з розмірами цих клітин у тварин, які не отримували екстракту можна припустити, що

збільшення площі, яку займають β -ендокриноцити зумовлено здатністю біологічно активних компонентів екстракту *G. officinalis* не лише знижувати пошкоджуючий вплив гіперглікемії, а також й стимулювати поділ стовбурових клітин підшлункової залози (Bonner-Weir, 2000; Dickson & Rhodes, 2004).

Отже, введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам зі стрептозотоцин-індукованим діабетом виявляє виражену антидіабетичну дію, а саме, зумовлює зниження рівня глікемії натще, концентрації глікованого гемоглобіну, покращує толерантність до глюкози, стимулює секрецію інсуліну, а також виявляє цитопротекторний вплив на інкреторний апарат підшлункової залози. Цікаво, що введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* тваринам контрольної групи істотно не впливало на досліджувані показники. Відтак, екстракт *G. officinalis* виявляє гіпоглікемічну дію лише за умов високої концентрації глюкози, яка є характерною для цієї патології.

Встановлений гіпоглікемічний ефект безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* зумовлений наявністю у складі цього екстракту БАР з потенційною гіпоглікемічною дією, а саме фітолу, етилового естеру пальмітинової кислоти, фітостеролів (стігмастеролу та кампестеролу), похідних хіназоліну або їхньою синергічною дією. З літератури відомо, що фітол знижує інсулінорезистентність, підвищує чутливість до інсуліну клітин м'язів, пригнічує глюконеогенез та регулює метаболічні порушення, завдяки активації RXR (retinoid X receptor), який посилює експресію гена GLUT2 та підвищує рівень мРНК глюкокінази (Elmazar et al., 2013). Фітостероли (кампестерол і стігмастерол), які містяться у складі екстракту здатні знижувати рівень глікованого гемоглобіну (Josepha et al., 2013). Також є дані про те, що естери пальмітинової кислоти зумовлюють дозозалежне зниження концентрації глюкози у плазмі крові тварин з ЕЦД (Tanaka et al., 2006).

У роботі Wang et al. (M. Wang et al., 2012) показано, що стигмастерол у дозах 50 та 100 мг/кг покращує транслокацію GLUT4 та поглинання глюкози в клітинах L6 у разі його введення мишам з діабетом впродовж 4 тижнів. Також

було встановлено зниження рівня глюкози і глікованого гемоглобіну, нормалізацію активності глюкозо-6-фосфатази, фруктози-1,6-бісфосфатази й лактатдегідрогенази, а також підвищення концентрації інсуліну та виражену регенерацію β -клітин у щурів з ЦД, яким вводили цей фітостерол (Bakrim et al., 2022). Можливим механізмом антидіабетичних ефектів стигмастеролу, який був з'ясовний за допомогою молекулярного докінг-аналізу є його зв'язування з сиртуїном 4, NAD-залежним ензимом з деацилазною активністю, який пригнічує секрецію інсуліну, індуковану лейцином і глутаматдегідрогеназою (Reza et al., 2020).

α -Амірин, вміст якого в екстракті становить 1,9 % впливає на систему канабіноїдів. Показано, що деякі ліганди до канабіноїдних рецепторів CB1 можуть зв'язуватися та алостерично регулювати Kir6.2/SUR1 АТФ-залежні калієві, тим самим контролюючи глюкозостимульовану секрецію інсуліну. Крім цього α - та β -амірину притаманні протизапальні та антиоксидантні властивості (F. A. Santos et al., 2012).

Домінуючим компонентом безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* є α -ліноленова кислота (33,0 %). Відомо, що омега-3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) збільшують плинність клітинних мембран, сприяють підвищенню кількості рецепторів до інсуліну та підвищують спорідненість інсуліну до цих рецепторів, збільшують кількість транспортерів глюкози GLUT 4 і регулюють баланс між про- і антиоксидантами (Rodriguez-Leyva et al., 2010).

У складі екстракту також виявлено похідне хіназоліну – 2-метил-1,2,3а,4,5-гексагідропіроло-[1,2-а] хіназолін (2,9 %). Ці похідні активують АМФК – ключову кіназу, яка регулює енергетичний метаболізм, внаслідок чого підвищується поглинання глюкози м'язовими клітинами (Leclerc et al., 2004).

Дослідження гіпоглікемічних властивостей водних екстрактів кореневої (кореневі бульби, шкірки корневих бульб) та надземної (листки, стебла, черешки) частин *S. sonchifolius* у дозі 70 мг/кг показали, що всі досліджувані частини рослини ефективно знижують рівень глюкози у крові щурів при

одноразовому введенні (стебла < черешки < шкірки кореневих бульб < листки < кореневі бульби). Найкращий гіпоглікемічний ефект проявляли водні екстракти листя і кореневих бульб *S. sonchifolius*.

Проте при курсовому введенні впродовж 14 днів для компенсації гіперглікемії за умов ЕЦД ця доза екстрактів виявилася недостатньою. При підвищенні дози екстрактів, які вводили тваринам з ЕЦД до 500 мг/кг встановлено виражену гіпоглікемічну дію. Суспензії кореневих бульб найефективніше знижують постпрандіальний рівень глікемії (про що свідчить зниження площі під глікемічними кривими), а екстракт кореневих бульб *S. sonchifolius* – базальний рівень глікемії, який оцінювали за вмістом глюкози і глікозильованого гемоглобіну. Як вже згадувалося, кореневі бульби є багатим джерелом ністози, 1-кестози та 1-фруктофуранозилністози. Завдяки обволікаючій здатності, ФОС сповільнюють всмоктування моносахаридів у ШКТ, про що свідчить покращення толерантності до глюкози. До того ж у складі кореневих бульб містяться похідні кавової кислоти, які інгібують α -глюкозидазу (див. розд. 1.3.2)

У листі містяться фенольні кислоти, які володіють гіпоглікемічною дією. Серед них хлорогенова кислота, яка інгібує глюкозо-6-фосфатазу. Листя *S. sonchifolius* містить сесквітерпеновий лактон енгідрин, який пригнічує активність α -глюкозидази. Також серед БАР листя є поліфеноли, які пригнічують всмоктування глюкози ентероцитами кишківника, інгібуючи натрійзалежний котранспортер глюкози.

Завдяки наявності БАР з потенційною гіпоглікемічною дією як Ел⁵⁰⁰ і Ек⁵⁰⁰, так і суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius* знижують постпрандіальний рівень глюкози. При цьому, БАР у формі суспензії кореневих бульб виявляють вираженіший вплив на толерантність до глюкози, аніж у формі екстракту. Можна припустити, що саме у такій, подрібненій формі краще проявляється обволікаюча дія ФОС. Проте, як з'ясувалося, Ек⁵⁰⁰ найкраще знижував рівень глюкози та глікованого гемоглобіну. Вираженіший коригуючий ефект

екстракту кореневих бульб ми пов'язуємо кращою доступністю мікробіоти товстої кишки до розчинних волокон ФОС та регуляторним впливом SCFA, які утворюються як кінцеві продукти ферментації ФОС кишковою мікробіотою на рівень глікемії (Paredes et al., 2018) (див. розд. 1.3.2).

Варто зауважити, що стабілізовані за допомогою біосурфактанту PS-17 фітопрепарати на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* ефективніше забезпечують компенсацію гіперглікемії за умов ЕЦД, порівняно з нестабілізованими вихідними сумішами. Застосування седиментаційно стійких фітопрепаратів забезпечувало чітке дотримання їхнього дозування та зумовлювало підвищення терапевтичного впливу завдяки ефективнішому засвоєнню діючих речовин.

Таким чином, різна ефективність антидіабетичної дії безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, а також екстрактів листя і кореневих бульб та суспензій кореневих бульб *S. sonchifolius* визначається різними механізмами антидіабетичної дії БАР, які містяться у складі цих фітопрепаратів та їхньою біодоступністю.

Добре відомо, що в результаті гіперглікемії активується низка метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення АФО. Надпродукція $\cdot\text{O}_2^-$, NO й NOO^- за умов ЦД призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу (Brownlee, 2003; Racher et al., 2007). За умов ЕЦД встановлено значне підвищення рівня АФО у лейкоцитах щурів, а також зростання активності NO-синтази та вмісту стабільних метаболітів NO – нітрит- та нітрат-аніонів. Як наслідок встановлено зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів та карбонільних груп протеїнів у лейкоцитах та еритроцитах периферичної крові щурів. Водночас нами було відмічено зниження активності ключових ензимів АОС – СОД, каталази та ГПО у досліджуваних клітинах крові.

Порівнюючи стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за умов ЕЦД у клітинах крові було відмічено, що процеси ПОЛ активуються у більшій

мірі, ніж процеси ОМП. Найвищий вміст окисномодифікованих протеїнів та ліпідів показано в еритроцитах. При цьому, активність ензимів АОЗ в еритроцитах пригнічується у більшій мірі, ніж у лейкоцитах.

Підтверджено антиоксидантний потенціал БАР, які містяться у складі досліджуваних фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* в модельних експериментах *in vitro*. На основі змін маркерних показників окисативно-нітративного стресу нами було підтверджено антиоксидантний ефект досліджуваних фітопрепаратів, при цьому виокремлено такі особливості:

1) компоненти безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* ефективно знижують рівень АФО у лейкоцитах, вміст стабільних метаболітів NO – нітриту та нітрат аніонів, вміст окисномодифікованих протеїнів, а також зумовлюють мобілізацію ензимів АОЗ – СОД і каталази за умов ЕЦД; серед фітопрепаратів *S. sonchifolius* у лейкоцитах найвираженішу антиоксидантну дію виявляє стабілізована суспензія корневих бульб (Ск^{PS}) *S. sonchifolius*; 2) введення безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* пригнічує активність iNOS та знижує вміст нітриту та нітрат-аніонів та продуктів ПОЛ, а також запобігає інгібуванню активності ГПО та зумовлює підвищення вмісту відновленого глутатіону у підшлунковій залозі; 3) найефективніше запобігають накопиченню продуктів ПОЛ та ОМП в еритроцитах безалкалоїдний екстракт *G. officinalis*, екстракт листя у дозі 500 мг/кг (Ел⁵⁰⁰) та суспензії корневих бульб (Ск і Ск^{PS}); підвищення активності ензимів АОС зумовлюють БАР у складі фітопрепаратів як *G. officinalis*, так і *S. sonchifolius*.

Антиоксидантна дія безалкалоїдного екстракту *G. officinalis* зумовлена наявністю у її складі сполук з потенційною антиоксидантною дією, серед них флавоноїди (кверцитин, мірицетин, лютеолін, апігенін, кемпферол); фенольні кислоти, з них домінуючими є: галова, гідроксибензойна, кумарова, транскорична, ферулова кислоти, фітол, сквален, вітамін Е (див. розд. 3.1.2).

Механізм дії кверцетину полягає у його здатності запобігати утворенню вільних радикалів, ПОЛ, підвищуючи рівень глутатіону. У роботі показано, що

кверцетин (20 мкмоль/л) може захищати β -клітини від окисного пошкодження та сприяти секреції інсуліну через шлях ERK1/2 у клітинах INS-1 (Youl et al., 2010). Мірицетин також пригнічує оксидативний стрес, підвищуючи активність антиоксидантних ензимів (SOD, CAT тощо) (Semwal et al., 2016).

Фенольні кислоти мають високий антиоксидантний потенціал завдяки наявності в молекулі ароматичного кільця, карбоксильної групи та однієї або декількох гідроксильних та/або метоксильних груп (Pereira et al., 2016). Кількість і положення фенольних гідроксилів безпосередньо впливають на антиоксидантну активність фенольних кислот. Навідміну від флавоноїдів, вільні фенольні кислоти, такі як бензойна, транс-корична кислоти, мають вищу біодоступність і хорошу розчинність у воді (Barrington et al., 2009; J. Chen et al., 2020; Yaribeygi et al., 2020).

Дослідження *in vitro* продемонстрували антиоксидантні властивості фітолу, які зумовлені наявністю у складі цієї молекули гідроксильної групи (C. S. de M. P. Santos et al., 2013). Скавенджером гідроксильних радикалів також виступає сквален, який є ефективнішим антиоксидантом, ніж ендогенний відновлений глутатіон (GSH) (Das et al., 2003). Підтвердженою антиоксидантною дією володіє інозитол, яка полягає у захисті від окиснення полієнових жирних кислот, а саме арахідонової (Farias et al., 2011).

Ліноленова кислота інгібує індуковану ліпополісахаридом експресію генів iNOS, циклооксигенази-2 завдяки блокуванню NF- κ B і MAPK-кінази (Ok et al., 2020) і таким чином виявляє не лише протизапальну, але й антиоксидантну дію.

Серед БАР з антиоксидантною дією, які містяться у листі *S. sonchifolius* важливу роль відіграють фенольні кислоти, а саме хлорогенова, протокатехова, п-кумарова, ферулова та похідні кавової кислоти (Ferraz et al., 2020; Lachman et al., 2003a). Хлорогенова кислота і триптофан були ідентифіковані як два основних антиоксиданти коренів *S. sonchifolius* (Cao et al., 2018). Бульби

S. sonchifolius слугують джерелом флавоноїдів, включаючи кверцетин (Simonovska et al., 2003).

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок про те, що біологічно активні компоненти, виділені з *G. officinalis* та *S. sonchifolius* запобігають розвитку оксидативно-нітративного стресу за ЕЦД завдяки їхньої здатності скавенджерувати вільні радикали та запобігати інгібуванню ключових компонентів АОС. Проте, вираженість антиоксидантної дії досліджуваних фітопрепаратів відрізняється, що зумовлено відмінностями їхнього компонентного складу.

Відомо, що ЦД супроводжуються хронічним запаленням і пригніченням імунної відповіді, що сприяє розвитку хронічних ускладнень цього захворювання (Bajrai & Tilley, 2018). Клітини периферичної крові, зокрема, лейкоцити, які відіграють важливу роль у запаленні та імунних реакціях, найбільше зазнають впливу високої концентрації глюкози. Хронічна гіперглікемія призводить до утворення цитотоксичних сполук (АФО, прозапальні цитокіни, тощо), стимулює низку стрес-залежних сигнальних каскадів (NF- κ B, кіназ p38 MAPK та JNK), які залучені до ушкодження клітин та розвитку ускладнень цукрового діабету (Drel, 2010). Такі зміни зазвичай пов'язані з підвищеною мобілізацією лейкоцитів, що зумовлює зміни в їхнього структурно-функціонального стану (Bajrai & Tilley, 2018). Динамічна реорганізація цитоскелету у результаті полімеризації – деполімеризації актину має важливе значення для здійснення багатьох клітинних процесів, включаючи міграцію лейкоцитів.

За умов ЕЦД встановлено зростання вмісту полімеризованого актину в лейкоцитах щурів, що вказує на зміну структурно-функціональних властивостей і преактивований стан цих клітин. При цьому, на фоні підвищення загального рівня F-актину відмічено зменшення кількості актинових філаментів цитоскелету та одночасне збільшення вмісту коротких філаментів актину. Преактивація лейкоцитів пов'язана зі структурно-функціональною

перебудовою рецепторного апарату цих клітин, яка найчастіше зумовлена змінами структури сіаловмісних вуглеводних детермінант поверхневих глікопротеїнів та функціональної активності ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази (ФІ-3'-кінази), якій відіграє важливе значення у формуванні локомоторної функції лейкоцитів за різних патологій (Aiba et al., 2008). Такі структурні модифікації впливають на трансдукцію зовнішніх імпульсів, які проводяться по сигнальних мережах клітини і задіяні у регуляції процесів реорганізації актинового цитоскелету.

Використовуючи сіалоспецифічні лектини було показано, що за досліджуваної патології підвищується кількість експонованих олігоцукрових детермінант мембран лейкоцитів, у структуру яких входять залишки N-ацетил- β ,D-глюкозаміну і сіалових кислот, та зменшується кількість поверхневих глікокон'югатів, які містять сіалові кислоти, приєднані $\alpha 2 \rightarrow 3$ і $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидними зв'язками до субтермінальних залишків галактози. Міжмолекулярні взаємодії, опосередковані β ,D-галактозовмісними компонентами поверхні нейтрофільних гранулоцитів, активують тирозинкіназний шлях трансдукції клітинних сигналів, кінази фокальних контактів та PI-3'-кіназу (Fernandez-Rodríguez et al., 2000). Через галактозовмісні глікопротеїни регулюється міграція лейкоцитів під час запального процесу, що супроводжується динамічною перебудовою актинового цитоскелету.

Виявлені нами зміни у реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів за умов ЕЦД на фоні тривалої гіперглікемії, вірогідно, обумовлені переходом лейкоцитів у преактивований стан, який у значній мірі є результатом активації і транслокації регуляторної субодиниці ФІ-3'-кінази у сайти цитоскелету, які опосередковують інтегрин-залежну фокальну адгезію клітин (Sheu et al., 2004). ФІ-3'-кіназа та її продукти беруть безпосередню участь у регуляції процесу утворення структур цитоскелету (Samstag et al., 2003). За наявності в клітині продуктів ФІ-3'-кінази (фосфатидилінозитол-3,4-дифосфату і

фосфатидилінозитол-1,3,4-трифосфату) від актинових філаментів дисоціюють кеп-білки, внаслідок чого активується полімеризація актину. Фосфатидилінозитолі також можуть виступати інгібіторами фосфорилування актин-регуляторних протеїнів. Ці протеїни-регулятори впливають на перерозподіл актинових філаментів – знижують вміст актинових філаментів цитоскелету і пропорційно викликають зростання рівня актину у фракції коротких філаментів і мономерів (Kleveta et al., 2012).

Введення досліджуваного екстракту тваринам, хворим на ЦД призводило до зниження вмісту F-актину і коротких філаментів цитоскелету лейкоцитів. 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.

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. Активация 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 таким здатні пригнічувати

процеси глікування, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету, а також впливати на вміст прозапального цитокіну ФНП- α , який регулює локомоторну здатність лейкоцитів. З літературних джерел відомо, що кінцеві продукти глікації індукують процес полімеризації актину (F. A. Santos et al., 2012).

Серед БАР, які містяться у складі екстракту *G. officinalis* потужну імуномодулюючу та протизапальну дію виявляють поліненасичені жирні кислоти та стигмастерол. Стигмастерол знижує секрецію прозапальних медіаторів, таких як TNF- α , NO, IL-1 β та IL-6, а також інгібує COX-2 (Sharif et al., 2022; Wen et al., 2021). Препарати на основі стигмастеролу широко використовують у китайській традиційній медицині для контролю імунної запальної реакції, зокрема, при лікуванні коронавірусної хвороби (COVID-19) (H.-L. Li et al., 2022).

Молекулярні механізми протизапальної дії ω -3 поліненасичених жирних кислот включають активацію та надмірну експресію АМФ-активованої протеїнкінази (AMPK) та протеїндацетилази сиртуїну1 (SIRT1) з подальшим пригніченням стрес-чутливого фактора транскрипції NF- κ B внаслідок деацетилювання субодиниці p65 (Inoue et al., 2017). На тваринних моделях було доведено, що омега-3 поліненасичені жирні кислоти пригнічують запалення шляхом пригнічення регуляції miR-19b-3p, miR-146b-5p та miR-183-5p впливаючи на TLR, NOD-подібний рецептор (NLR), RIG-I-подібний рецептор, MAPK та TGF- β шляхи (Albracht-Schulte et al., 2018).

Розвиток ЕЦД супроводжувався підвищенням проліферативної активності попередників лейкоцитів у кістковому мозку, що є компенсаторною реакцією у відповідь на зниження кількості лейкоцитів у периферичній крові в результаті інтенсифікації апоптозу. 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 PK C і TLR-4 (Lien & Ingalls, 2002). З іншого боку, TNF- α є прозапальним цитокіном, 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 ФНП- α .

Відомо, що TNF- α , відіграє важливу роль у патогенезі аутоімунного діабету 1 типу. TNF- α бере безпосередню участь у руйнуванні β -клітин *in vitro* і індукує запальні ефекти *in vivo*, діючи безпосередньо на антигенпрезентуючі клітини та аутореактивні Т-лімфоцити (Christen et al., 2001). Збільшення вмісту TNF- α при ЦД порушує трансдукцію інсулінового сигналу, пригнічуючи фосфорилування тирозину у складі рецептора інсуліну та субстрату рецептора інсуліну-1 (IRS-1) в адипоцитах. Ліполіз-стимулюючий ефект ФНП- α призводить до підвищення рівня вільних жирних кислот у плазмі крові, зниження чутливості до інсуліну. Ці ефекти TNF- α призводять до зниження поглинання глюкози м'язами та збільшення вироблення глюкози печінкою. Останні дані свідчать про те, що TNF- α також регулює експресію кількох генів адипоцитів, які, як відомо, модулюють чутливість/резистентність до інсуліну. TNF- α може навіть знижувати функцію β -клітин завдяки прямих ефектів, що підтверджує його важливу роль у розвитку ЦД (Knobler & Schattner, 2005).

Зниження кількості метамієлоцитів, що призводило до зниження чисельності незрілих нейтрофілів можна пояснити зміною співвідношення медіаторів, які стимулюють диференціацію клітин-попередників у зрілі нейтрофіли, або змінами кількості рецепторів до цих медіаторів на поверхні плазматичної мембрани попередників мієлоїдного ряду. З літератури відомо,

що на ранніх стадіях ЦД може значно знижуватися рівень гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого чинника (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Водночас, розвиток мікроангіопатій і порушення функціонального стану епітелію кровоносних судин може обмежувати дію колонієстимулюючих чинників навіть за умов, коли їхній рівень є у межах норми (Alnek et al., 2015).

Зниження попередників нейтрофілів у кістковому мозку за умов ЕЦД може відбуватися внаслідок зростання вмісту TNF- α (табл. 2, рис. 3). Є літературні дані про те, що TNF- α пригнічує утворення гранулоцитарно-макрофагальних попередників *in vitro* та гемопоетичних попередників *in vivo*. Зокрема, у роботі (Drutskaya et al., 2005) показано підвищену продукцію зрілих гранулоцитів та збільшення кількості гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників (КУО-ГМ) у кістковому мозку мишей з дефіцитом TNF- α , що свідчить про можливий інгібуючий вплив цього цитокіну на мієлопоез *in vitro*. Введення безалкалоїдного екстракту *Galega 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. Тому ми припустили, 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- κ B і MAPK, інгібуючи транслокацію у ядро NF- κ B і пригнічуючи фосфорилування I κ B α , ERK, JNK і p38, що знижує синтез маркерів запалення (Juárez-Chairez et al., 2022; Zia et al., 2020),

Серед БАР, які містяться в екстракті *G. officinalis* показано, що сквален виявляє імуномодуючу дію. Встановлено, що сквален знижує внутрішньоклітинний рівень АФО та низки цитокінів TNF- α , IL-1 β , IL-6 та IFN- γ , пригнічуючи експресію генів TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , iNOS та COX-2 у ЛПС-активованих нейтрофілах та моноцитах людини (Cárdeno et al., 2015). Також кампестерол сприяє зниженню продукції TNF- α (Brüll & Mensink, 2009). Важливим компонентом досліджуваного екстракту є фітол, який чинив протизапальну дію та пригнічував міграцію поліморфноядерних нейтрофілів, знижуючи рівні TNF- α та IL-1 β (Silva et al., 2014).

Зміни проліферації імунокомпетентних клітин за умов ЕЦД зумовлюють порушення імунного захисту організму. Літературні дані свідчать про порушення фагоцитозу і бактерицидної активності ПМН за умов ЦД 1 типу (Nabi et al., 2005).

За результатами визначення індексу завершеності фагоцитозу, показника, який характеризує перетравлювальну здатність нейтрофільних гранулоцитів ми робимо висновок про те, що за досліджуваної патології нейтрофіли повільніше вступають у фагоцитоз, порівняно з клітинами здорових тварин.

Застосування водних екстрактів листя і кореневих бульб *S. sonchifolius* у різних досліджуваних концентраціях та суспензій кореневих бульб коригують зміни фагоцитарної активності нейтрофілів за умов ЕЦД, на що вказує зростання ІЗФ при їхньому застосуванні.

Встановлено підвищення мієлопероксидазної активності у нейтрофілах тварин за умов ЕЦД. Активація мієлопероксидази супроводжується накопиченням високореакційноздатного бактерицидного чинника – гіпохлориту (OCl⁻). Гіпохлорит разом з іншими АФО, які залучені у реалізації кисеньзалежного механізму кілінгу патогенів, може зумовлювати пошкодження судин, опосередковане лейкоцитами (Gorudko et al., 2012). Натомість вміст катіонних протеїнів істотно не змінювався при ЦД. Головними антимікробними катіонними протеїнами, які наявні у гранулах поліморфноядерних нейтрофілів, є дефензини. Під час фагоцитозу багаті дефензином первинні гранули

зливаються з фагоцитарними вакуолями. Пермеабілізація мембран-мішеней є вирішальним етапом опосередкованої дефензинами антимікробної активності та цитотоксичності (Ganz, 2003). 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 розвиваються при ЦД.

Отже 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.

Підвищення рівня АФО та АФН зумовлює активацію JNK- та p38 сигнальних шляхів, запускаючи каскади реакцій фосфорилування. При цьому, індукція апоптозу може бути зумовлена активацією деяких факторів транскрипції (NF- κ B, p53) чи проапоптичних протеїнів Bax і Bad (Haddad, 2002). Протеїн p53 активує гени, що беруть участь в індукції загибелі клітини шляхом апоптозу або безпосередньо індукує апоптоз.

Протеїн Bcl-2 вияляє антиапоптотичну дію, зважаючи на його здатність зв'язувати п'ять інших протеїнів родини Bcl-2, яким притаманні

проапоптотичні функції. При індукції цього механізму порушується формування мітохондріальних пор та відбувається блокування виходу з мітохондрій цитохрому C та APAF-1, які активують каспазу-9 і запускають процеси власне апоптозу (Qian et al., 2022; Yang et al., 1997).

Досліджуючи співвідношення протеїнів Bcl-2/p53 та експонування фосфатидилсерину на зовнішньому боці плазматичної мембрани лейкоцитів було зроблено висновок про інтенсифікацію процесу апоптозу імунокомпетентних клітин крові за умов ЦД.

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.

Пригнічувальний вплив на прояв апоптозу за умов ЕЦД найбільшою мірою був виражений у разі введення тваринам безалкалоїдного екстракту *G. officinalis*, водного екстракту листа та стабілізованої суспензії кореневих бульб *S. sonchifolius*.

Встановлена антиапоптотична дія екстракту *G. officinalis*, на нашу думку, опосередкована впливом наявних у його складі компонентів з гіпоглікемічною (фітол, етиловий ефір пальмітинової кислоти, фітостероли – кампестерол та стигмастерин, похідні хіназолінів), антиоксидантною (фітол, флавоноїди, фенольні кислоти, вітамін E) та протизапальною (флавоноїди, метиловий ефір ліноленової кислоти, α -амірин) діями.

Антиапоптична БАР *S. sonchifolius* може бути зумовлена наявністю в їхньому складі поліфенолів (протокатехова, хлорогенова, кадова, розмаринова кислоти) та їхніх похідних і незамінної амінокислоти – триптофану, що відомі потужними антиоксидантними властивостями (Simonovska et al., 2003; Valentová et al., 2005).

Розвиток ЦД 1 типу супроводжується вираженими порушеннями у функціонуванні системи еритрону. Серед клітин крові, еритроцити, є

найбільшими споживачами глюкози. За тривалої гіперглікемії змінюється морфологія, метаболізм і функція еритроцитів, що неминуче впливає на гемореологію і мікроциркуляцію (Y. Wang et al., 2021). Збільшення концентрації HbA1c за умов ЕЦД призводить до розвитку хронічної гіпоксії, в результаті підвищується продукція еритропоєтину і, як наслідок, зростає добова продукція та кількість ретикулоцитів. Посилення еритропоезу за умов ЕЦД, супроводжується викидом в кровотік якісно змінених еритроцитів з порушеними структурно-функціональними властивостями, про що свідчить зниження стійкості до дії кислотного гемолітика клітин загальної нефракціонованої популяції та окремих різновікових популяцій еритроцитів. Зниження гемолітичної стійкості червоних клітин крові може бути обумовлена посиленням процесів ПОЛ та ОМП за досліджуваної патології. Також, отримані результати вказують на десіалювання вуглеводних детермінант молодих форм еритроцитів при ЕЦД. Зниження сіалювання глікокон'югатів мембран еритроцитів при ЦД пояснює на молекулярному рівні підвищення їхньої агрегаційної здатності (Rogers et al., 1992).

Встановлені структурні зміни мембран є підґрунтям пришвидшеного старіння еритроцитів за досліджуваної патології. Старіючі еритроцити піддаються внутрішньосудинному гемолізу або руйнуються макрофагами у селезінці, клітинах Купфера у печінці та у кістковому мозку. У відповідь на скорочення тривалості життя еритроцитів відмічено посилення еритропоезу.

Ми припускаємо, що підвищення стійкості мембран еритроцитів до гемолізу у відповідь на введення досліджуваних коригуючих чинників опосередковано впливом БАР фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* на ензими, які задіяні у сіалюванні поверхневих глікокон'югатів, а також їхньою антиоксидантною дією. Завдяки антиоксидантним властивостям фітокомпонентів препарати на основі досліджуваних лікарських рослин пригнічують процеси ПОЛ біомембран і таким чином запобігають десталізації

їхньої структурно-функціональної організації, що підтверджується нашими експериментальними даними.

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 імуномодуючої дії.

На рис. 4.1 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.

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 (завдяки посиленню сіалювання гліканів еритроцитів, і як наслідок зниження їхньої агрегаційної

здатності та пригнічення процесів ПОЛ, що зумовлює мембраностабілізуючу дію) є ознаками 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.

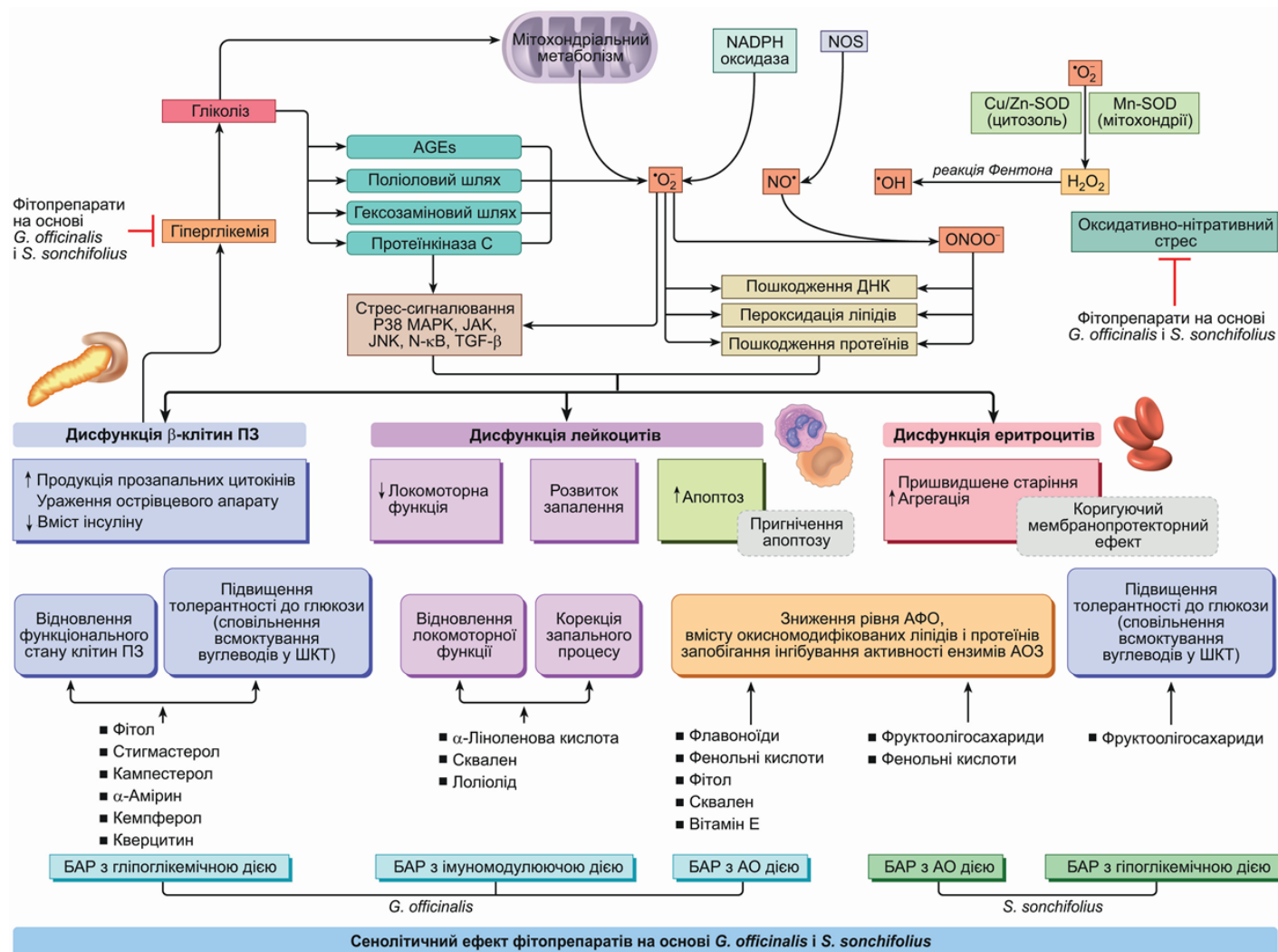


Рис. 4.1 Узагальнююча схема сенолітичного ефекту фітопрепаратів на основі *G. officinalis* та *S. sonchifolius* за ЕЦД, на якій зазначено можливі мішені впливу компонентів цих фітопрепаратів (АО дія – антиоксидантна дія).

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 якона *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 імунокомпетентних 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 імунокомпетентних 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 суспензії *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 ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антонюк, В. (2005). Лектини та їх сировинні джерела. Львів: Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького. – 554 с.
2. Беркало, Л., Бобович, О., & Боброва, Н. (2003). Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава : Полімет. – 320 с.
3. Державна Фармакопея України: В 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Вип. 1). (2015).
4. Коваленко В. М. (2001). Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / В. М. Коваленко, О. В. Стефанов, Ю. М. Максимов, І. М. Трахтенберг. К : Авіцена. – 527 с.
5. Ковальов В.М., Комісаренко М. Ф., & Халєєва Л. Д. (1985). Гіпоглікемічна активність флавоноїдів. Фармацевтичний журнал. 1. 51–54.
6. Лабудзинський, І., & Шиманський. (2014). Забезпеченість організму вітаміном D3 та функціональна активність фагоцитуючих клітин периферичної крові За експериментального цукрового діабету 1-го типу. 86 (2), 107–118.
7. Лапиніна Л. А. (1965). До питання про флавоноїдний склад трави козлятника лікарського. Фармацевтичний журнал. 1. 57–62.
8. Лаповець. (2004). Лабораторна імунологія / Л. Лаповець, Б. Луцик – К.: Арал. – 173 с.
9. Міщенко Л. Т. (2012). Нова овочева і лікарська культура в Україні. Наук. вісн. Нац. Ун-ту біоресурсів і природокорист. України. 180. С. 250–256.
10. Покинсьборода, Т. (2018). Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування. дис. ... канд. техн. наук. : 03.00.20 – біотехнологія. Київ. – 207 с.
11. Сибірна, Н., Бурда, В., & Чайка, Я. (2006). Методи дослідження системи крові. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. 2006. – 100 с.

12. Сибірна, Н., Маєвська, О., & Барська, М. (2006). Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. – 60 с.
13. Стасенко, А. (2021). Місцевий імунітет. К. : ННЦ «Інститут біології та медицини». 2021. – 153 с.
14. Токсиколого-гігієнічний паспорт біопрепарату PS (біоПАР PS). (2004). Львів. – 11 с. (Протокол експертизи Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедра гігієни та профілактичної токсикології № 01 від 27.01.2004 р.).
15. Шелудько, В., & Колесниченко, Ю. (1965). Практичний посібник з фармакогнозії: Фотохім. Аналіз. К. : Здоров'я. – 101 с.
16. Aborode, A. T., Awuah, W. A., Mikhailova, T., Abdul- Rahman, T., Pavlock, S., Kundu, M., Yarlagaadda, R., Pustake, M., Correia, I. F. da S., Mehmood, Q., Shah, P., Mehta, A., Ahmad, S., Asekun, A., Nansubuga, E. P., Amaka, S. O., Shkodina, A. D., & Alexiou, A. (2022). OMICs Technologies for Natural Compounds-based Drug Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 22(21), 1751–1765. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220726092034>.
17. Absolom, D. R. (1986). [3] Basic methods for the study of phagocytosis. *B Methods in Enzymology* (Вип. 132, с. 95–180). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(86\)32005-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(86)32005-6).
18. Advani, A., Marshall, S. M., & Thomas, T. H. (2004). Increasing neutrophil F-actin corrects CD11b exposure in Type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(5), 358–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01346.x>.
19. Aguilar F., E., & Bonilla R., P. (2009). Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallanthus son-chifolius* (yacón). *Ciencia e Investigación*, 12(1), 15–23. <https://doi.org/10.15381/ci.v12i1.3380>.
20. Aiba, Y., Kameyama, M., Yamazaki, T., Tedder, T. F., & Kurosaki, T. (2008). Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to

- phosphoinositide 3-kinase. *Blood*, 111(3), 1497–1503. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-109769>.
21. Alba-Loureiro, T. C., Munhoz, C. D., Martins, J. O., Cerchiaro, G. A., Scavone, C., Curi, R., & Sannomiya, P. (2007). Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(8), 1037–1044. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000143>.
 22. Albracht-Schulte, K., Kalupahana, N. S., Ramalingam, L., Wang, S., Rahman, S. M., Robert-McComb, J., & Moustaid-Moussa, N. (2018). Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: A mechanistic update. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.012>.
 23. Alevriadou, B. R., Patel, A., Noble, M., Ghosh, S., Gohil, V. M., Stathopoulos, P. B., & Madesh, M. (2021). Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(4), C465–C482. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00502.2020>.
 24. AL-Ishaq, Abotaleb, Kubatka, Kajo, & Büsselberg. (2019). Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules*, 9(9), 430. <https://doi.org/10.3390/biom9090430>.
 25. Al-Kassas, R., Bansal, M., & Shaw, J. (2017). Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *Journal of Controlled Release*, 260, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.003>.
 26. Alnek, K., Kisand, K., Heilman, K., Peet, A., Varik, K., & Uiibo, R. (2015). Increased Blood Levels of Growth Factors, Proinflammatory Cytokines, and Th17 Cytokines in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. *PLOS ONE*, 10(12), e0142976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142976>.

27. Al-Numair, K. S., Chandramohan, G., Veeramani, C., & Alsaif, M. A. (2015). Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Report*, 20(5), 198–209. <https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000117>.
28. Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A. M., Purrello, F., & Marchetti, P. (2005). Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 48(2), 282–289. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1627-9>.
29. Aoki, T. (2017). A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes*, 7(4), 56. <https://doi.org/10.3390/membranes7040056>.
30. Arif, S., Moore, F., Marks, K., Bouckennooghe, T., Dayan, C. M., Planas, R., Vives-Pi, M., Powrie, J., Tree, T., Marchetti, P., Huang, G. C., Gurzov, E. N., Pujol-Borrell, R., Eizirik, D. L., & Peakman, M. (2011). Peripheral and Islet Interleukin-17 Pathway Activation Characterizes Human Autoimmune Diabetes and Promotes Cytokine-Mediated β -Cell Death. *Diabetes*, 60(8), 2112–2119. <https://doi.org/10.2337/db10-1643>.
31. Arita, R., Nakao, S., Kita, T., Kawahara, S., Asato, R., Yoshida, S., Enaida, H., Hafezi-Moghadam, A., & Ishibashi, T. (2013). A Key Role for ROCK in TNF- α -Mediated Diabetic Microvascular Damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(3), 2373. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10757>.
32. Ashrafizadeh, M., Tavakol, S., Ahmadi, Z., Roomiani, S., Mohammadinejad, R., & Samarghandian, S. (2020). Therapeutic effects of kaempferol affecting autophagy and endoplasmic reticulum stress. *Phytotherapy Research*, 34(5), 911–923. <https://doi.org/10.1002/ptr.6577>.
33. Atkinson, M. A., von Herrath, M., Powers, A. C., & Clare-Salzler, M. (2015). Current Concepts on the Pathogenesis of Type 1 Diabetes—Considerations for

- Attempts to Prevent and Reverse the Disease. *Diabetes Care*, 38(6), 979–988. <https://doi.org/10.2337/dc15-0144>.
34. Bajpai, A., & Tilley, D. G. (2018). The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*, 9, 1547. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01547>.
 35. Bakrim, S., Benkhaira, N., Bourais, I., Benali, T., Lee, L.-H., El Omari, N., Sheikh, R. A., Goh, K. W., Ming, L. C., & Bouyahya, A. (2022). Health Benefits and Pharmacological Properties of Stigmasterol. *Antioxidants*, 11(10), 1912. <https://doi.org/10.3390/antiox11101912>.
 36. Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427–444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>.
 37. Barcellona, C. S., Cabrera, W. M., Honoré, S. M., Mercado, M. I., Sánchez, S. S., & Genta, S. B. (2012). Safety assessment of aqueous extract from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactone, enhydrin. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(2), 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.021>.
 38. Baroni, S., Suzuki-Kemmelmeier, F., Caparroz-Assef, S. M., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. A. (2008). Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(3), 521–530. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300024>.
 39. Barrington, R., Williamson, G., Bennett, R. N., Davis, B. D., Brodbelt, J. S., & Kroon, P. A. (2009). Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/TC7 cell model. *Journal of Functional Foods*, 1(1), 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2008.09.011>.

40. Battaglia, M. (2014). Neutrophils and type 1 autoimmune diabetes: Current Opinion in Hematology, 21(1), 8–15. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000008>.
41. Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends in Cell Biology, 11(9), 372–377. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5).
42. Bayat, A., Azizi-Soleiman, F., Heidari-Beni, M., Feizi, A., Iraj, B., Ghiasvand, R., & Askari, G. (2016). Effect of cucurbita ficifolia and probiotic yogurt consumption on blood glucose, lipid profile, and inflammatory marker in Type 2 Diabetes. International Journal of Preventive Medicine, 7(1), 30. <https://doi.org/10.4103/2008-7802.175455>.
43. Bednarska, K., Kuś, P., & Fecka, I. (2020). Investigation of the Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Methylglyoxal Trapping Effect of Galega officinalis L. Herb In Vitro. Molecules, 25(24), 5810. <https://doi.org/10.3390/molecules25245810>.
44. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
45. Bhansali, S., Bhansali, A., Walia, R., Saikia, U. N., & Dhawan, V. (2017). Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. Frontiers in Endocrinology, 8, 347. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00347>.
46. Blandino-Rosano, M., Chen, A. Y., Scheys, J. O., Alejandro, E. U., Gould, A. P., Taranukha, T., Elghazi, L., Cras-Méneur, C., & Bernal-Mizrachi, E. (2012). MTORC1 signaling and regulation of pancreatic β -cell mass. Cell Cycle, 11(10), 1892–1902. <https://doi.org/10.4161/cc.20036>.
47. Boillot, J., Alamowitch, C., Berger, A.-M., Luo, J., Bruzzo, F., Bornet, F. R. J., & Slama, G. (1995). Effects of dietary propionate on hepatic glucose production, whole-body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism

- in normal rats. *British Journal of Nutrition*, 73(2), 241–251. <https://doi.org/10.1079/BJN19950026>.
48. Bonner-Weir, S. (2000). Perspective: Postnatal Pancreatic β Cell Growth. *Endocrinology*, 141(6), 1926–1929. <https://doi.org/10.1210/endo.141.6.7567>.
49. Bozadjieva, N., Blandino-Rosano, M., Chase, J., Dai, X.-Q., Cummings, K., Gimeno, J., Dean, D., Powers, A. C., Gittes, G. K., Rüegg, M. A., Hall, M. N., MacDonald, P. E., & Bernal-Mizrachi, E. (2017). Loss of mTORC1 signaling alters pancreatic α cell mass and impairs glucagon secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 127(12), 4379–4393. <https://doi.org/10.1172/JCI90004>.
50. Briehl, M. M., Cotgreave, I. A., & Powis, G. (1995). Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2(1), 41–46.
51. Broniowska, K. A., Oleson, B. J., McGraw, J., Naatz, A., Mathews, C. E., & Corbett, J. A. (2015). How the Location of Superoxide Generation Influences the β -Cell Response to Nitric Oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7952–7960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627869>.
52. Brownlee, M. (2003). A radical explanation for glucose-induced β cell dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1788–1790. <https://doi.org/10.1172/JCI200320501>.
53. Brüll, F., & Mensink, R. (2009). Plant sterols: Functional lipids in immune function and inflammation? *Clinical Lipidology*, 4(3), 355–365. <https://doi.org/10.2217/clp.09.26>.
54. Bruun, C., Heding, P. E., Rønn, S. G., Frobøse, H., Rhodes, C. J., Mandrup-Poulsen, T., & Billestrup, N. (2009). Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits tumor necrosis factor- α induced apoptosis and signalling in beta cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 311(1–2), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.019>.
55. Bulegenov, K. E., & Balmukhanov, B. S. (1993). [Effect of alcian blue effect on erythrocyte aggregation]. *Kardiologiia*, 33(4), 42–44.

56. Burkly, L. C., Jakubowski, A., & Hattori, M. (1994). Protection Against Adoptive Transfer of Autoimmune Diabetes Mediated Through Very Late Antigen-4 Integrin. *Diabetes*, 43(4), 529–534. <https://doi.org/10.2337/diab.43.4.529>.
57. Caetano, B., de Moura, N., Almeida, A., Dias, M., Sivieri, K., & Barbisan, L. (2016). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. *Nutrients*, 8(7), 436. <https://doi.org/10.3390/nu8070436>.
58. Cao, Y., Ma, Z., Zhang, H., Jin, Y., Zhang, Y., & Hayford, F. (2018). Phytochemical Properties and Nutrigenomic Implications of Yacon as a Potential Source of Prebiotic: Current Evidence and Future Directions. *Foods*, 7(4), 59. <https://doi.org/10.3390/foods7040059>.
59. Cárdeno, A., Aparicio-Soto, M., Montserrat-de la Paz, S., Bermudez, B., Muriana, F. J. G., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2015). Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *Journal of Functional Foods*, 14, 779–790. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.009>.
60. Carreras, M. C., & Poderoso, J. J. (2007). Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(5), C1569–C1580. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2006>.
61. Cassatella, M. A. (1999). Neutrophil-Derived Proteins: Selling Cytokines by the Pound. In *Advances in Immunology* (Вип. 73, с. 369–509). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60791-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60791-9).
62. Castro, A., Caballero, M., Herbas, A., & Carballo, S. (2012). Antioxidants in yacon products and effect of long term storage. *Food Science and Technology*, 32(3), 432–435. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000064>.
63. Champavier, Y., Allais, D. P., Chulia, A. J., & Kaouadji, M. (2000). Acetylated and Non-acetylated Flavonol Triglycosides from *Galega officinalis*. *Chemical*

- and Pharmaceutical Bulletin, 48(2), 281–282.
<https://doi.org/10.1248/cpb.48.281>.
64. Chemler, J. A., Lock, L. T., Koffas, M. A. G., & Tzanakakis, E. S. (2007). Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 797–807. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1227-y>.
 65. Chen, J., Cárcamo, J. M., & Golde, D. W. (2006). The α Subunit of the Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor Interacts with c-Kit and Inhibits c-Kit Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 22421–22426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604644200>.
 66. Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., & Kim, C. K. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10(1), 2611. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>.
 67. Chen, M., Yang, Z. D., Smith, K. M., Carter, J. D., & Nadler, J. L. (2005). Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity. *Diabetologia*, 48(3), 486–495. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1673-y>.
 68. Chern, C. J., & Beutler, E. (1976). Biochemical and electrophoretic studies of erythrocyte pyridoxine kinase in white and black Americans. *American Journal of Human Genetics*, 28(1), 9–17.
 69. Choque Delgado, G. T., da Silva Cunha Tamashiro, W. M., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2013). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(3), 222–228. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0362-0>.
 70. Christen, U., Wolfe, T., Möhrle, U., Hughes, A. C., Rodrigo, E., Green, E. A., Flavell, R. A., & von Herrath, M. G. (2001). A Dual Role for TNF- α in Type 1 Diabetes: Islet-Specific Expression Abrogates the Ongoing Autoimmune Process When Induced Late but Not Early During Pathogenesis. *The Journal of*

71. Christodoulou, M.-I., Tchoumtchoua, J., Skaltsounis, A.-L., Scorilas, A., & Halabalaki, M. (2019). Natural Alkaloids Intervening the Insulin Pathway: New Hopes for Anti-Diabetic Agents? *Current Medicinal Chemistry*, 26(32), 5982–6015. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180430152618>.
72. Cicero, A. F. G., & Baggioni, A. (2016). Berberine and Its Role in Chronic Disease. B S. C. Gupta, S. Prasad, & B. B. Aggarwal (Ред.), *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases* (Вип. 928, с. 27–45). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1_2.
73. Coniglio, S., Shumskaya, M., & Vassiliou, E. (2023). Unsaturated Fatty Acids and Their Immunomodulatory Properties. *Biology*, 12(2), 279. <https://doi.org/10.3390/biology12020279>.
74. Costa, V. M. V., Amorim, M. A., Quintanilha, A., & Moradas-Ferreira, P. (2002). Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: The involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1507–1515. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01086-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01086-9).
75. Crocker, P. (2005). Siglecs in innate immunity. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(4), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.03.003>.
76. Cruz, P. N., Fetzer, D. L., do Amaral, W., de Andrade, E. F., Corazza, M. L., & Masson, M. L. (2019). Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO₂ + ethanol solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.01.007>.
77. Cunha, D. A., Hekerman, P., Ladrière, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M. C., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A. K., Bellomo, E., Overbergh, L., Mathieu, C., Lupi, R., Hai, T., Herchuelz, A., Marchetti, P., Rutter, G. A., Eizirik, D. L., & Cnop, M. (2008). Initiation and execution of

- lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. *Journal of Cell Science*, 121(14), 2308–2318. <https://doi.org/10.1242/jcs.026062>.
78. Danylovych, G. V., Bohach, T. V., Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Danylovych, Yu. V., & Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv. (2018). The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 90(1), 3–24. <https://doi.org/10.15407/ubj90.01.003>.
 79. Das, B., Baidya, A. T. K., Mathew, A. T., Yadav, A. K., & Kumar, R. (2022). Structural modification aimed for improving solubility of lead compounds in early phase drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 56, 116614. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116614>.
 80. Das, B., Yeager, H., Baruchel, H., Freedman, M. H., Koren, G., & Baruchel, S. (2003). In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity. *European Journal of Cancer*, 39(17), 2556–2565. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.07.002>.
 81. Dashchenko, A., Novozhylov, V., Hlushchenko, L., Taran, N., Marchyshyn, S., & Mishchenko, L. (2016). New promising alien species of yacon (*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. Et Endl.) H. Robinson) for medicinal plant cultivation in Ukraine. *Agroecological journal*, 2, 39–46. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.2.2016.248279>.
 82. Davidson, S., & Duchon, M. (2006). Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*, 71(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.01.019>.
 83. Dawson, J., & Knowles, R. G. (1999). Microtiter-Plate Assay of Nitric Oxide Synthase Activity. *Molecular Biotechnology*, 12(3), 275–280. <https://doi.org/10.1385/MB:12:3:275>.
 84. Delaviz, H., Mohammadi, J., Ghalamfarsa, G., Mohammadi, B., & Farhadi, N. (2017). A review study on phytochemistry and pharmacology applications of

- Juglans Regia plant. Pharmacognosy Reviews, 11(22), 145.
https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_10_17.
85. Demine, S., Schiavo, A. A., Marín-Cañas, S., Marchetti, P., Cnop, M., & Eizirik, D. L. (2020). Pro-inflammatory cytokines induce cell death, inflammatory responses, and endoplasmic reticulum stress in human iPSC-derived beta cells. Stem Cell Research & Therapy, 11(1), 7.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1523-3>.
 86. Demkovych, A., Bondarenko, Y., & Hasiuk, P. A. (2017). Oxidative modification of proteins in the process of experimental periodontitis development. Interventional Medicine and Applied Science, 9(4), 218–221.
<https://doi.org/10.1556/1646.9.2017.28>.
 87. Den Hartogh, D. J., & Tsiani, E. (2019). Antidiabetic Properties of Naringenin: A Citrus Fruit Polyphenol. Biomolecules, 9(3), 99.
<https://doi.org/10.3390/biom9030099>.
 88. Diamanti-Kandarakis, E., Piperi, C., Patsouris, E., Korkolopoulou, P., Panidis, D., Pawelczyk, L., Papavassiliou, A. G., & Duleba, A. J. (2007). Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. Histochemistry and Cell Biology, 127(6), 581–589. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0265-3>.
 89. Diana, J., & Lehuen, A. (2014). Macrophages and β -cells are responsible for CXCR2-mediated neutrophil infiltration of the pancreas during autoimmune diabetes. EMBO Molecular Medicine, 6(8), 1090–1104.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201404144>.
 90. Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., & Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. Nature Medicine, 19(1), 65–73.
<https://doi.org/10.1038/nm.3042>.
 91. Dickson, L. M., & Rhodes, C. J. (2004). Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: A role for protein kinase B in the Akt? American

- Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 287(2), E192–E198.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00031.2004>.
92. Ding, M., Fang, Q.-H., Cui, Y.-T., Shen, Q.-L., Liu, Q., Wang, P.-H., Yu, D.-M., & Li, C.-J. (2019). Liraglutide prevents β -cell apoptosis via inactivation of NOX2 and its related signaling pathway. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 33(4), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.12.013>.
 93. Drel, V. R. (2010). Main mechanisms of the initiation and development of diabetic complications: The role of nitrate stress. *Studia Biologica*, 4(2), 141–158. <https://doi.org/10.30970/sbi.0402.085>.
 94. Drutskaya, M. S., Ortiz, M., Liepinsh, D. J., Kuprash, D. V., Nedospasov, S. A., & Keller, J. R. (2005). Inhibitory effects of tumor necrosis factor on hematopoiesis seen in vitro are translated to increased numbers of both committed and multipotent progenitors in TNF-deficient mice. *Experimental Hematology*, 33(11), 1348–1356. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.08.001>.
 95. Dunne, J. L., Collins, R. G., Beaudet, A. L., Ballantyne, C. M., & Ley, K. (2003). Mac-1, but Not LFA-1, Uses Intercellular Adhesion Molecule-1 to Mediate Slow Leukocyte Rolling in TNF- α -Induced Inflammation. *The Journal of Immunology*, 171(11), 6105–6111. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6105>.
 96. Durazzo, A., D'Addezio, L., Camilli, E., Piccinelli, R., Turrini, A., Marletta, L., Marconi, S., Lucarini, M., Lisciani, S., Gabrielli, P., Gambelli, L., Aguzzi, A., & Sette, S. (2018). From Plant Compounds to Botanicals and Back: A Current Snapshot. *Molecules*, 23(8), 1844. <https://doi.org/10.3390/molecules23081844>.
 97. Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., & Ichii, H. (2021). The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>.

98. Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>.
99. Elfering, S. L., Haynes, V. L., Traaseth, N. J., Ettl, A., & Giulivi, C. (2004). Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(1), H22–H29. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00766.2003>.
100. Elmazar, M. M., El-Abhar, H. S., Schaalán, M. F., & Farag, N. A. (2013). Phytol/Phytanic Acid and Insulin Resistance: Potential Role of Phytanic Acid Proven by Docking Simulation and Modulation of Biochemical Alterations. *PLoS ONE*, 8(1), e45638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045638>.
101. Elsbach, P., & Weiss, J. (1985). Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunology Letters*, 11(3–4), 159–163. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(85\)90163-4](https://doi.org/10.1016/0165-2478(85)90163-4).
102. Evans, J. L., Maddux, B. A., & Goldfine, I. D. (2005). The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(7–8), 1040–1052. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1040>.
103. Farias, V. X., Macêdo, F. H. P., Oquendo, M. B., Tomé, A. R., Báó, S. N., Cintra, D. O. S., Santos, C. F., Albuquerque, A. A. C., Heimark, D. B., Larner, J., Fonteles, M. C., Leal-Cardoso, J. H., & Nascimento, N. R. F. (2011). Chronic treatment with d-chiro-inositol prevents autonomic and somatic neuropathy in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(3), 243–250. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01344.x>.
104. Fatima, N., Hafizur, R. M., Hameed, A., Ahmed, S., Nisar, M., & Kabir, N. (2017). Ellagic acid in *Embllica officinalis* exerts anti-diabetic activity through the action on β -cells of pancreas. *European Journal of Nutrition*, 56(2), 591–601. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1103-y>.

105. Fernández-Rodríguez, J., Feijoo-Carnero, C., Merino-Trigo, A., Pérez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F. J., de Carlos, A., Butrón, M., & Martínez-Zorzano, V. S. (2000). Immunohistochemical Analysis of Sialic Acid and Fucose Composition in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Tumor Biology*, 21(3), 153–164. <https://doi.org/10.1159/000030122>.
106. Fernandes, J., Vogt, J., & Wolever, T. M. S. (2012). Intravenous acetate elicits a greater free fatty acid rebound in normal than hyperinsulinaemic humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(9), 1029–1034. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.98>.
107. Ferraz, A. P. C. R., Garcia, J. L., Costa, M. R., Almeida, C. C. V. de, Gregolin, C. S., Alves, P. H. R., Hasimoto, F. K., Berchieri-Ronchi, C. B., dos Santos, K. C., & Corrêa, C. R. (2020). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) use as an antioxidant in diabetes. *B Pathology* (c. 379–386). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00036-6>.
108. Flier, J. S., Underhill, L. H., & Eisenbarth, G. S. (1986). Type I Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 314(21), 1360–1368. <https://doi.org/10.1056/NEJM198605223142106>.
109. Fu, Z., & Liu, D. (2009). Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic β -cells. *European Journal of Pharmacology*, 616(1–3), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.005>.
110. Ganz, T. (2003). Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>.
111. Gelfman, M.I., Kovalevich, O.V., & Yustratov, V.P. (2008). *Colloid Chemistry: Textbook for Universities*. Publishing house «Lan».
112. Georgiadou, E., & Rutter, G. A. (2020). Control by Ca^{2+} of mitochondrial structure and function in pancreatic β -cells. *Cell Calcium*, 91, 102282. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102282>.

113. Georgiou, G., Lin, S.-C., & Sharma, M. M. (1992). Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Nature Biotechnology*, 10(1), 60–65. <https://doi.org/10.1038/nbt0192-60>.
114. Gercel-Taylor, C. (2005). Diphenylamine Assay of DNA Fragmentation for Chemosensitivity Testing. B R. D. Blumenthal, Chemosensitivity (Вип. 111, с. 079–082). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-889-7:079>.
115. Gharaei-Fa, E. (2010). Biosurfactants in Pharmaceutical Industry (A Mini-Review). *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(1), 58–69. <https://doi.org/10.3923/ajdd.2011.58.69>.
116. Goldstone, A., Liochev, S., & Fridovich, I. (2006). Inactivation of Copper, Zinc superoxide dismutase by H₂O₂: Mechanism of protection. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1860–1863. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.015>.
117. Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>.
118. Gorudko, I. V., Kostevich, V. A., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Buko, I. V., Konstantinova, E. E., Vasiliev, V. B., Cherenkevich, S. N., & Panasenko, O. M. (2012). Functional Activity of Neutrophils in Diabetes Mellitus and Coronary Heart Disease: Role of Myeloperoxidase in the Development of Oxidative Stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 154(1), 23–26. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1865-7>.
119. Gottfredsen, R. H., Larsen, U. G., Enghild, J. J., & Petersen, S. V. (2013). Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biology*, 1(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.004>.
120. Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, C. V., Pushpangadan, P., Asare-Anane, H., Persaud, S., Jones, P., & Houghton, P. J. (2010). Antidiabetic

- activity of *Croton klotzianus* in rats and direct stimulation of insulin secretion in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(3), 371–376. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.3.0013>.
121. Graham, R. C., & Karnovsky, M. J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 14(4), 291–302. <https://doi.org/10.1177/14.4.291>.
 122. Greenberg, A. S., & McDaniel, M. L. (2002). Identifying the links between obesity, insulin resistance and β -cell function: Potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(s3), 24–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.4.x>.
 123. Guermouche, B., Soulimane-Mokhtari, N. A., Bouanane, S., Merzouk, H., Merzouk, S., & Narce, M. (2014). Effect of Dietary n—3 Polyunsaturated Fatty Acids on Oxidant/Antioxidant Status in Macrosomic Offspring of Diabetic Rats. *BioMed Research International*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/368107>.
 124. Gurgul-Convey, E., Mehmeti, I., Plötz, T., Jörns, A., & Lenzen, S. (2016). Sensitivity profile of the human EndoC- β H1 beta cell line to proinflammatory cytokines. *Diabetologia*, 59(10), 2125–2133. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4060-y>.
 125. Haddad, J. J. (2002). Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respiratory Research*, 3(1), 25. <https://doi.org/10.1186/rr190>.
 126. Hahmann, C., & Schroeter, T. (2010). Rho-kinase inhibitors as therapeutics: From pan inhibition to isoform selectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(2), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0189-x>.
 127. Hannigan, M., Zhan, L., Ai, Y., & Huang, C.-K. (2001). Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal

- reorganization in murine neutrophils in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(3), 497–504. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.3.497>.
128. Haurogné, K., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Bach, J.-M., & Lieubeau, B. (2015). Type 1 Diabetes Prone NOD Mice Have Diminished Cxcr1 mRNA Expression in Polymorphonuclear Neutrophils and CD4⁺ T Lymphocytes. *PLOS ONE*, 10(7), e0134365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134365>.
 129. Hong, S. S., Lee, S. A., Han, X. H., Lee, M. H., Hwang, J. S., Park, J. S., Oh, K.-W., Han, K., Lee, M. K., Lee, H., Kim, W., Lee, D., & Hwang, B. Y. (2008). Melampolides from the Leaves of *Smallanthus sonchifolius* and Their Inhibitory Activity of LPS-Induced Nitric Oxide Production. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(2), 199–202. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.199>.
 130. Honore, S. M., & Genta, S. (2015). *Smallanthus sonchifolius* (Yacon) leaves: An emerging source of compounds for diabetes management. 5, 21–42.
 131. Hsu, C.-Y., Shih, H.-Y., Chia, Y.-C., Lee, C.-H., Ashida, H., Lai, Y.-K., & Weng, C.-F. (2014). Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(6), 1168–1176. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300691>.
 132. Huang, J., Xiao, Y., Xu, A., & Zhou, Z. (2016). Neutrophils in type 1 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(5), 652–663. <https://doi.org/10.1111/jdi.12469>.
 133. Huang, Y.-X., Wu, Z.-J., Mehrishi, J., Huang, B.-T., Chen, X.-Y., Zheng, X.-J., Liu, W.-J., & Luo, M. (2011). Human red blood cell aging: Correlative changes in surface charge and cell properties. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(12), 2634–2642. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01310.x>.
 134. Hudish, L. I., Reusch, J. E. B., & Sussel, L. (2019). β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4001–4008. <https://doi.org/10.1172/JCI129188>.

135. IDF Diabetes Atlas 2021–10th edition (Online version of IDF Diabetes Atlas: www.diabetesatlas.org). (2021).
136. Inoue, T., Tanaka, M., Masuda, S., Ohue-Kitano, R., Yamakage, H., Muranaka, K., Wada, H., Kusakabe, T., Shimatsu, A., Hasegawa, K., & Satoh-Asahara, N. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(5), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.02.010>.
137. Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., Chandra Shill, M., Karmakar, U. K., Yarla, N. S., Khan, I. N., Billah, M. M., Pieczynska, M. D., Zengin, G., Malainer, C., Nicoletti, F., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Apostolov, A., Banach, M., ... Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>.
138. Jaafar, R., Tran, S., Shah, A. N., Sun, G., Valdearcos, M., Marchetti, P., Masini, M., Swisa, A., Giacometti, S., Bernal-Mizrachi, E., Matveyenko, A., Hebrok, M., Dor, Y., Rutter, G. A., Koliwad, S. K., & Bhushan, A. (2019). MTORC1-to-AMPK switching underlies β cell metabolic plasticity during maturation and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4124–4137. <https://doi.org/10.1172/JCI127021>.
139. Jaillon, S., Galdiero, M.R., Del Prete, D., Cassatella, M. A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2013). Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunopathology*, 35(4), 377–394. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0374-8>.
140. Jakubowska-Solarska, B., & Solski, J. (2000). Sialic acids of young and old red blood cells in healthy subjects. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 6(5), 871–874.
141. Jasmin, S., Ali, M., Ferdous, M., Arslan, M. I., & Biswas, S. K. (2019). Glucose transporter 4 gene expression in peripheral blood leukocytes in type 2 diabetes

- mellitus. Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University Journal, 12(1), 19–24. <https://doi.org/10.3329/bsmmuj.v12i1.40467>.
142. Jazayeri, L., Callaghan, M. J., Grogan, R. H., Hamou, C. D., Thanik, V., Ingraham, C. R., Capell, B. C., Pelo, C. R., & Gurtner, G. C. (2008). Diabetes Increases p53-Mediated Apoptosis following Ischemia: Plastic and Reconstructive Surgery, 121(4), 1135–1143. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000302499.18738.c2>.
 143. Jong-Anurakkun, N., Bhandari, M. R., & Kawabata, J. (2007). α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*). Food Chemistry, 103(4), 1319–1323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.043>.
 144. Josepha, S., Theophilus, F., Dominic, E., Rita, D., Kwaw, M., Kofi, A., Eric, W., George, K., Alfred, A., & Henry, B. (2013). Antihyperglycaemic and antioxidant effects of *Adenia Lobata* Engl (Passifloraceae) in streptozotocin-induced diabetic rats. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 10(5), 386–393. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.28>.
 145. Juárez-Chairez, M. F., Meza-Márquez, O. G., Márquez-Flores, Y. K., & Jiménez-Martínez, C. (2022). Potential anti-inflammatory effects of legumes: A review. British Journal of Nutrition, 128(11), 2158–2169. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000137>.
 146. Jud, P., & Sourij, H. (2019). Therapeutic options to reduce advanced glycation end products in patients with diabetes mellitus: A review. Diabetes Research and Clinical Practice, 148, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.11.016>.
 147. Kahl, R., Kampkötter, A., Wätjen, W., & Chovolou, Y. (2004). Antioxidant Enzymes and Apoptosis. Drug Metabolism Reviews, 36(3–4), 747–762. <https://doi.org/10.1081/DMR-200033488>.
 148. Kalousová, M., Zima, T., Tesař, V., & Lachmanová, J. (2002). Advanced Glycation End Products and Advanced Oxidation Protein Products in Hemodialyzed Patients. Blood Purification, 20(6), 531–536. <https://doi.org/10.1159/000066956>.

149. Keim, A. L., Chi, M. M. -Y., & Moley, K. H. (2001). Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53. *Molecular Reproduction and Development*, 60(2), 214–224. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080>.
150. Khalid, M., Petroianu, G., & Adem, A. (2022). Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. *Biomolecules*, 12(4), 542. <https://doi.org/10.3390/biom12040542>.
151. Khajehei, K., Merkt, N., Claupein, W., Graeff-Hoenninger, S. (2018). Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) as a Novel Source of Health Promoting Compounds: Antioxidant Activity, Phytochemicals and Sugar Content in Flesh, Peel, and Whole Tubers of Seven Cultivars. *Molecules*. 23(2), 278; <https://doi.org/10.3390/molecules23020278>.
152. Kiran, G. S., Ninawe, A. S., Lipton, A. N., Pandian, V., & Selvin, J. (2015). Rhamnolipid biosurfactants: Evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–17. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.979758>.
153. Kitamura, T. (2013). The role of FOXO1 in β -cell failure and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(10), 615–623. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.157>.
154. Kleveta, G., Borzęcka, K., Zdioruk, M., Czerkies, M., Kuberczyk, H., Sybirna, N., Sobota, A., & Kwiatkowska, K. (2012). LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 80–92. <https://doi.org/10.1002/jcb.23330>.
155. Knobler, H., & Schattner, A. (2005). TNF- α , chronic hepatitis C and diabetes: A novel triad. *QJM*, 98(1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hci001>.
156. Kukreja, A., & Maclaren, N. K. (1999). Autoimmunity and Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(12), 4371–4378. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.12.6212>.

157. Kumar, S., Mittal, A., Babu, D., & Mittal, A. (2021). Herbal Medicines for Diabetes Management and its Secondary Complications. *Current Diabetes Reviews*, 17(4), 437–456. <https://doi.org/10.2174/1573399816666201103143225>.
158. Kuok, I. T., Rountree, A. M., Jung, S.-R., & Sweet, I. R. (2019). Palmitate is not an effective fuel for pancreatic islets and amplifies insulin secretion independent of calcium release from endoplasmic reticulum. *Islets*, 11(3), 51–64. <https://doi.org/10.1080/19382014.2019.1601490>.
159. Kwiatkowska, K., Frey, J., & Sobota, A. (2003). Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: The role of membrane rafts. *Journal of Cell Science*, 116(3), 537–550. <https://doi.org/10.1242/jcs.00254>.
160. Lachman, J., Fernández, E. C., & Orsák, M. (2003a). Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. Et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use—A review. *Plant, Soil and Environment*, 49(6), 283–290. <https://doi.org/10.17221/4126-PSE>.
161. Lachman, J., Fernández, E. C., Viehmannová, I., Šulc, M., & ěepková, P. (2007). Total phenolic content of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35(1), 117–123. <https://doi.org/10.1080/01140670709510175>.
162. Lau, Y. S., Tian, X. Y., Mustafa, M. R., Murugan, D., Liu, J., Zhang, Y., Lau, C. W., & Huang, Y. (2013). Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II -mediated BMP4 -oxidative stress cascade. *British Journal of Pharmacology*, 170(6), 1190–1198. <https://doi.org/10.1111/bph.12350>.
163. Leclerc, I., Woltersdorf, W. W., da Silva Xavier, G., Rowe, R. L., Cross, S. E., Korbitt, G. S., Rajotte, R. V., Smith, R., & Rutter, G. A. (2004). Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: Impact

- on glucose-stimulated insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(6), E1023–E1031. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00532.2003>.
164. Lee, A. Y., Chung, H. K., Kyong Bae, E., Hwang, J. S., Sung, B. W., Cho, C. W., Kim, J.-K., Lee, K., Han, J. Y., Lee, C.-T., & Youn, H. J. (2003). A recombinant human G-CSF/GM-CSF fusion protein from *E. coli* showing colony stimulating activity on human bone marrow cells. *Biotechnology Letters*, 25(3), 205–211. <https://doi.org/10.1023/A:1022346800375>.
 165. Lee, Y.-M., Haastert, B., Scherbaum, W., & Hauner, H. (2003). A phytosterol-enriched spread improves the lipid profile of subjects with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Nutrition*, 42(2), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0401-y>.
 166. Lehuen, A., Diana, J., Zacccone, P., & Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 501–513. <https://doi.org/10.1038/nri2787>.
 167. Li, H.-L., Zhou, J.-P., & Deng, J.-M. (2022). Therapeutic Mechanism of Xiaoqinglong Decoction against COVID-19Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 25(13), 2264–2277. <https://doi.org/10.2174/1386207325666220228154231>.
 168. Li, X., Geng-Ji, J.-J., Quan, Y.-Y., Qi, L.-M., Sun, Q., Huang, Q., Jiang, H.-M., Sun, Z.-J., Liu, H.-M., & Xie, X. (2022). Role of potential bioactive metabolites from traditional Chinese medicine for type 2 diabetes mellitus: An overview. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1023713. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1023713>.
 169. Lien, E., & Ingalls, R. R. (2002). Toll-like receptors. *Critical Care Medicine*, 30 (1 Suppl), S1-11.

170. Lin, C.-Y., Huang, P.-J., & Chao, C.-Y. (2014). Chlorella Protects Against Hydrogen Peroxide-Induced Pancreatic β -Cell Damage. *Journal of Medicinal Food*, 17(12), 1273–1280. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.3002>.
171. Liu, X., Zheng, J., & Zhou, H. (2011). TLRs as pharmacological targets for plant-derived compounds in infectious and inflammatory diseases. *International Immunopharmacology*, 11(10), 1451–1456. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.027>.
172. Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Barrientos, G., Valencia, M., Mears, D., & Hidalgo, C. (2015). Glucose-Dependent Insulin Secretion in Pancreatic β -Cell Islets from Male Rats Requires Ca^{2+} Release via ROS-Stimulated Ryanodine Receptors. *PLOS ONE*, 10(6), e0129238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129238>.
173. Lowry, O. H, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1). P. 265–275.
174. Maedler, K., Schulthess, F. T., Bielman, C., Berney, T., Bonny, C., Prentki, M., Donath, M. Y., & Roduit, R. (2008). Glucose and leptin induce apoptosis in human β - cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases. *The FASEB Journal*, 22(6), 1905–1913. <https://doi.org/10.1096/fj.07-101824>.
175. Malorni, W., Straface, E., Rivabene, R., Rainaldi, G., Giammarioli, A. M., & Matarrese, P. (1996). Protection from apoptosis by antioxidants: the importance of cell adhesion. *Biochemical Society Transactions*, 24(4), 531S-531S. <https://doi.org/10.1042/bst024531sa>.
176. Mandrup-Poulsen, T., Bendtzen, K., Dinarello, C. A., & Nerup, J. (1987). Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 139(12), 4077–4082.
177. Maratou, E., Dimitriadis, G., Kollias, A., Boutati, E., Lambadiari, V., Mitrou, P., & Raptis, S. A. (2007). Glucose transporter expression on the plasma membrane

- of resting and activated white blood cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 37(4), 282–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x>.
178. Marchyshyn, S, Hudz, N., & Dakhym, I., & Husak, L. (б. д.). Analysis of phenolic compounds from *Polymnia sonchifolia* Poepp. Et Endl. Leaves by HPLC-method. 2017, 6, 980–983.
 179. Marelli-Berg, F. M., & Jangani, M. (2018). Metabolic regulation of leukocyte motility and migration. *Journal of Leukocyte Biology*, 104(2), 285–293. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR1117-472R>.
 180. Marmugi, A., Parnis, J., Chen, X., Carmichael, L., Hardy, J., Mannan, N., Marchetti, P., Piemonti, L., Bosco, D., Johnson, P., Shapiro, J. A. M., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Ibberson, M., Thorens, B., Valdivia, H. H., Rutter, G. A., & Leclerc, I. (2016). Sorcin Links Pancreatic β -Cell Lipotoxicity to ER Ca^{2+} Stores. *Diabetes*, 65(4), 1009–1021. <https://doi.org/10.2337/db15-1334>.
 181. Masuda, Y., Vaziri, N. D., Li, S., Le, A., Hajighasemi-Ossareh, M., Robles, L., Foster, C. E., Stamos, M. J., Al-Abodullah, I., Ricordi, C., & Ichii, H. (2015). The Effect of Nrf2 Pathway Activation on Human Pancreatic Islet Cells. *PLOS ONE*, 10(6), e0131012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131012>.
 182. Matsuzaki, S., Eyster, C., Newhardt, M. F., Giorgione, J. R., Kinter, C., Young, Z. T., Kinter, M., & Humphries, K. M. (2021). Insulin signaling alters antioxidant capacity in the diabetic heart. *Redox Biology*, 47, 102140. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102140>.
 183. Meiselman, H. J., Neu, B., Rampling, M. W., & Baskurt, O. K. (2007). RBC aggregation: Laboratory data and models. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(1), 9–17.
 184. Merzbach, D., & Obedeau, N. (1975). Standardisation of the nitroblue-tetrazolium test. *Journal of Medical Microbiology*, 8(2), 375–384. <https://doi.org/10.1099/00222615-8-2-375>.

185. Middleton, Jr., M.D., E. (1996). Biological Properties of Plant Flavonoids: An Overview. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(5), 344–348. <https://doi.org/10.1076/phbi.34.5.344.13245>.
186. Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). P53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell*, 11(3), 577–590. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00050-9).
187. Miki, A., Ricordi, C., Sakuma, Y., Yamamoto, T., Misawa, R., Mita, A., Molano, R. D., Vaziri, N. D., Pileggi, A., & Ichii, H. (2018). Divergent antioxidant capacity of human islet cell subsets: A potential cause of beta-cell vulnerability in diabetes and islet transplantation. *PLOS ONE*, 13(5), e0196570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196570>.
188. Miyagi, T., & Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology*, 22(7), 880–896. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws057>.
189. Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids—Next generation surfactants? *Journal of Biotechnology*, 162(4), 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>.
190. Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
191. Nabi, A. H. M. N., Islam, L. N., Rahman, M. M., & Biswas, K. B. (2005). Polymorphonuclear Neutrophil Dysfunctions in Streptozotocin-induced Type 1 Diabetic Rats. *BMB Reports*, 38(6), 661–667. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.6.661>.
192. Nagalievskaa, M., Sabadashka, M., & Sybirna, N. (2021). Red Wine and Yacon as a Source of Bioactive Compounds with Antidiabetic and Antioxidant

- Potential. B. M. Akram (Ред.), *Alternative Medicine—Update*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94042>.
193. Nakao, S., Kuwano, T., Ishibashi, T., Kuwano, M., & Ono, M. (2003). Synergistic Effect of TNF- α in Soluble VCAM-1-Induced Angiogenesis Through α 4 Integrins. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5704–5711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5704>.
 194. Nankar, R. P., & Doble, M. (2017). Hybrid drug combination: Anti-diabetic treatment of type 2 diabetic Wistar rats with combination of ellagic acid and pioglitazone. *Phytomedicine*, 37, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.014>.
 195. Newsholme, P., Keane, K. N., Carlessi, R., & Cruzat, V. (2019). Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: Importance to cell metabolism, function, and dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317(3), C420–C433. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00141.2019>.
 196. Nguyen, N. T., & Varela, J. E. (2017). Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: State of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(3), 160–169. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.170>.
 197. Nicholls, S. J., & Hazen, S. L. (2005). Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(6), 1102–1111. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000163262.83456.6d>.
 198. Ninova, D., Dean, P. G., & Stegall, M. D. (2004). Immunomodulation through inhibition of multiple adhesion molecules generates resistance to autoimmune diabetes in NOD mice. *Journal of Autoimmunity*, 23(3), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.07.002>.
 199. Ohde, S., Deshpande, G. A., Yokomichi, H., Takahashi, O., Fukui, T., & Yamagata, Z. (2018). HbA1c monitoring interval in patients on treatment for stable type 2 diabetes. A ten-year retrospective, open cohort study. *Diabetes*

- Research and Clinical Practice, 135, 166–171.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.11.013>.
200. Ohyama, T., Ito, O., Yasuyoshi, S., Ikarashi, T., Minamisawa, K., Kubota, M., Tsukihashi, T., & Asami, T. (1990). Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition*, 36(1), 167–171. <https://doi.org/10.1080/00380768.1990.10415724>.
 201. Ok, F., Kaplan, H. M., Kizilgok, B., & Demir, E. (2020). Protective effect of Alpha-Linolenic acid on Lipopolysaccharide-Induced Orchitis in mice. *Andrologia*, 52(9). <https://doi.org/10.1111/and.13667>.
 202. Okokon, J., Bassey, A., & Obot, J. (2006). Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus* Muell.(thunder plant) in alloxan diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 3(2). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v3i2.31153>.
 203. Oliveira, R. B., Chagas-Paula, D. A., Secatto, A., Gasparoto, T. H., Faccioli, L. H., Campanelli, A. P., & Da Costa, F. B. (2013). Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 497–505. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000032>.
 204. Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>
 205. Öztürk, E., Arslan, A. K. K., Yerer, M. B., & Bishayee, A. (2017). Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.070>.
 206. Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>.
 207. Pamplona R. (2011). Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-Biological Interactions*, 192(1–2), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.01.007>.

208. Panossian, A. G., Efferth, T., Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Kuchta, K., Mukherjee, P. K., Banerjee, S., Heinrich, M., Wu, W., Guo, D., & Wagner, H. (2021). Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 630–703. <https://doi.org/10.1002/med.21743>.
209. Papa, F. R. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress, Pancreatic -Cell Degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9), a007666–a007666. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007666>.
210. Pardhi, D. S., Panchal, R. R., Raval, V. H., Joshi, R. G., Poczai, P., Almalki, W. H., & Rajput, K. N. (2022). Microbial surfactants: A journey from fundamentals to recent advances. *Frontiers in Microbiology*, 13, 982603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982603>.
211. Paredes, L. L. R., Smiderle, F. R., Santana-Filho, A. P., Kimura, A., Iacomini, M., & Sassaki, G. L. (2018). Yacon fructans (*Smallanthus sonchifolius*) extraction, characterization and activation of macrophages to phagocyte yeast cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1074–1081. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.034>
212. Park, D. W., Jiang, S., Tadie, J.-M., Stigler, W. S., Gao, Y., Deshane, J., Abraham, E., & Zmijewski, J. W. (2013). Activation of AMPK Enhances Neutrophil Chemotaxis and Bacterial Killing. *Molecular Medicine*, 19(1), 387–398. <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00065>.
213. Pelekh, I., Dilai, N., Bilous, S., Vildanova, R., & Shulha, O. (2017). The study of PS biocomplex as a promising antimicrobial preservative in compositions of medicinal and cosmetic products. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 0(3 (7)), 11–14. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2017.103442>.
214. Pellegrini, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

215. Peng, X., Ma, J., Chen, F., & Wang, M. (2011). Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*, 2(6), 289. <https://doi.org/10.1039/c1fo10034c>.
216. Pereira, J. A. R., Teixeira, M. C., Saczk, A. A., Barcelos, M. de F. P., Oliveira, M. F. de, & Abreu, W. C. de. (2016). Total antioxidant activity of yacon tubers cultivated in Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(5), 596–605. <https://doi.org/10.1590/1413-70542016405009416>.
217. Peshev, D., & Van den Ende, W. (2014). Fructans: Prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*, 8, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.005>.
218. Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.
219. Plaisance, V., Brajkovic, S., Tenenbaum, M., Favre, D., Ezanno, H., Bonnefond, A., Bonner, C., Gmyr, V., Kerr-Conte, J., Gauthier, B. R., Widmann, C., Waeber, G., Pattou, F., Froguel, P., & Abderrahmani, A. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL. *PLOS ONE*, 11(9), e0163046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163046>.
220. Psichas, A., Sleeth, M. L., Murphy, K. G., Brooks, L., Bewick, G. A., Hanyaloglu, A. C., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., & Frost, G. (2015). The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *International Journal of Obesity*, 39(3), 424–429. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.153>.
221. Putta, S., & Eswar, K. (2015). Review on methods of estimation of advanced glycation end products. 1, 689–699.
222. Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 12, 985363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>.

223. Rabinovitch, A. (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes / Metabolism Reviews*, 14(2), 129–151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0895\(199806\)14:2<129::AID-DMR208>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0895(199806)14:2<129::AID-DMR208>3.0.CO;2-V)
224. Rajchl, A., Fernández Cusimamani, E., Prchalová, J., Ševčík, R., Čížková, H., Žiarovská, J., & Hrdličková, M. (2018). Characterisation of yacon tuberous roots and leaves by DART-TOF/MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 424, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.11.005>.
225. Ram, V. J., Farhanullah, Tripathi, B. K., & Srivastava, A. K. (2003). Synthesis and antihyperglycemic activity of suitably functionalized 3H-quinazolin-4-ones☆. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(11), 2439–2444. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00142-1).
226. Rampling, M. W., Meiselman, H. J., Neu, B., & Baskurt, O. K. (2004). Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology*, 41(2), 91–112.
227. Rasouli, H., Yarani, R., Pociot, F., & Popović-Djordjević, J. (2020). Anti-diabetic potential of plant alkaloids: Revisiting current findings and future perspectives. *Pharmacological Research*, 155, 104723. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104723>.
228. Reza, M. S., Shuvo, M. S. R., Hassan, M. M., Basher, M. A., Islam, M. A., Naznin, N. E., Jafrin, S., Ahmed, K. S., Hossain, H., & Daula, A. F. M. S. U. (2020). Antidiabetic and hepatoprotective potential of whole plant extract and isolated compounds of *Aeginetia indica*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110942. <https://doi.org/10.1016/j.biopha..110942>.
229. Rizvi, S. I., & Zaid, M. A. (2001). Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: Effect of insulin and epicatechin. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 52(3), 483–488.

230. Robertson, R. P. (2004). Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42351–42354. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400019200>.
231. Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: Potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl024>.
232. Rodriguez-Leyva, D., Bassett, C. M. C., McCullough, R., & Pierce, G. N. (2010). The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(9), 489–496. [https://doi.org/10.1016/S0828-282X\(10\)70455-4](https://doi.org/10.1016/S0828-282X(10)70455-4).
233. Roep, B. O. (2013). β -Cells, Autoimmunity, and the Innate Immune System: “Un Ménage à Trois”? *Diabetes*, 62(6), 1821–1822. <https://doi.org/10.2337/db13-0276>.
234. Rogers, M. E., Williams, D. T., Niththyananthan, R., Rampling, M. W., Heslop, K. E., & Johnston, D. G. (1992). Decrease in erythrocyte glycophorin sialic acid content is associated with increased erythrocyte aggregation in human diabetes. *Clinical Science*, 82(3), 309–313. <https://doi.org/10.1042/cs0820309>.
235. Rolim, P. M., Salgado, S. M., Padilha, V. M., Livera, A. V. S., Andrade, S. A. C., & Guerra, N. B. (2011). Glycemic profile and prebiotic potential «in vitro» of bread with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 467–474. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000200029>.
236. Roma, L. P., & Jonas, J.-C. (2020). Nutrient Metabolism, Subcellular Redox State, and Oxidative Stress in Pancreatic Islets and β -Cells. *Journal of Molecular Biology*, 432(5), 1461–1493. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.012>.
237. Russo, D., Malafronte, N., Frescura, D., Imbrenda, G., Faraone, I., Milella, L., Fernandez, E., & De Tommasi, N. (2015). Antioxidant activities and qualitative analysis of different *Smallanthus sonchifolius* [(Poepp. And Endl.)

- H. Robinson] landrace extracts. *Natural Product Research*, 29(17), 1673–1677. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.990906>.
238. Salehi, Ata, V. Anil Kumar, Sharopov, Ramírez-Alarcón, Ruiz-Ortega, Abdulmajid Ayatollahi, Tsouh Fokou, Kobarfard, Amiruddin Zakaria, Iriti, Taheri, Martorell, Sureda, Setzer, Durazzo, Lucarini, Santini, Capasso, ... Sharifi-Rad. (2019). Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. *Biomolecules*, 9(10), 551. <https://doi.org/10.3390/biom9100551>.
 239. Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., & Wabnitz, G. H. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(1), 30–48. <https://doi.org/10.1189/jlb.0602272>.
 240. Santos, C. C. de M. P., Salvadori, M. S., Mota, V. G., Costa, L. M., de Almeida, A. A. C., de Oliveira, G. A. L., Costa, J. P., de Sousa, D. P., de Freitas, R. M., & de Almeida, R. N. (2013). Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. *Neuroscience Journal*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/949452>.
 241. Santos, F. A., Frota, J. T., Arruda, B. R., de Melo, T. S., da Silva, A. A. de C. A., Brito, G. A. de C., Chaves, M. H., & Rao, V. S. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-98>.
 242. Sarkodie J.A. (2013). Antihyperglycaemic activity of ethanolic extract of the stem of *Adenia lobata* Engl (Passifloraceae). *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 4(4), 1370–1377.
 243. Sato, Y., Fujimoto, S., Mukai, E., Sato, H., Tahara, Y., Ogura, K., Yamano, G., Ogura, M., Nagashima, K., & Inagaki, N. (2014). Palmitate induces reactive oxygen species production and β -cell dysfunction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase through Src signaling. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jdi.12124>.

244. Sekhon Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. S. M. (2014). Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>.
245. Seleznev, K., Zhao, C., Zhang, X. H., Song, K., & Ma, Z. A. (2006). Calcium-independent Phospholipase A2 Localizes in and Protects Mitochondria during Apoptotic Induction by Staurosporine. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 22275–22288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604330200>.
246. Semeniuk, I., Kochubei, V., Skorokhoda, V., Pokynbroda, T., Midyana, H., Karpenko, E., Melnyk, V. (2020). Biosynthesis Products of *Pseudomonas* sp. PS-17 Strain Metabolites. 1. Obtaining and Thermal Characteristics. *Chemistry & Chemical Technology*, 14(1), 26–31. <https://doi.org/10.23939/chcht14.01.026>.
247. Semwal, D., Semwal, R., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2016). Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*, 8(2), 90. <https://doi.org/10.3390/nu8020090>.
248. Seyd-Hosein Abtahi-Evari. (2017). Protective Effect of *Galega officinalis* Extract on Streptozotocin-Induced Kidney Damage and Biochemical Factor in Diabetic Rats. 4(3), 108–114.
249. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
250. Sharif, M., Anjum, I., Shabbir, A., & Mushtaq, M. N. (2022). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Aerva lanata* in ovalbumin induced allergic asthmatic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 289, 115087. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115087>.
251. Sheu, M. L., Ho, F. M., Chao, K. F., Kuo, M. L., & Liu, S. H. (2004). Activation of Phosphoinositide 3-kinase in Response to High Glucose Leads to Regulation of Reactive Oxygen Species-Related Nuclear Factor- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 Expression in Mesangial Cells. *Molecular Pharmacology*, 66(1), 187–196. <https://doi.org/10.1124/mol.66.1.187>.

252. Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., & Makarov, V. G. (2018). Challenges in the investigation of combinatory modes of action of nutrients and pharmaceuticals. *Synergy*, 7, 36–38. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2018.10.002>.
253. Silva, R. O., Sousa, F. B. M., Damasceno, S. R. B., Carvalho, N. S., Silva, V. G., Oliveira, F. R. M. A., Sousa, D. P., Aragão, K. S., Barbosa, A. L. R., Freitas, R. M., & Medeiros, J. V. R. (2014). Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28(4), 455–464. <https://doi.org/10.1111/fcp.12049>.
254. Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K., & Ulrichová, J. (2003). Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X).
255. Singh, A., Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1), 99–121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004>.
256. Singh, M., & Shin, S. (2009). Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: A brief review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(1), 7–15.
257. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *B Methods in Enzymology* (Вип. 299, с. 152–178). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
258. Siriwan, D., Naruse, T., & Tamura, H. (2011). Effect of epoxides and α -methylene- γ -lactone skeleton of sesquiterpenes from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves on caspase-dependent apoptosis and NF- κ B inhibition in human cervical cancer cells. *Fitoterapia*, 82(7), 1093–1101. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.07.007>.

259. Soomro, S. (2019). Oxidative Stress and Inflammation. *Open Journal of Immunology*, 09(01), 1–20. <https://doi.org/10.4236/oji.2019.91001>.
260. Spiller, F., Carlos, D., Souto, F. O., de Freitas, A., Soares, F. S., Vieira, S. M., Paula, F. J. A., Alves-Filho, J. C., & Cunha, F. Q. (2012). A1-Acid Glycoprotein Decreases Neutrophil Migration and Increases Susceptibility to Sepsis in Diabetic Mice. *Diabetes*, 61(6), 1584–1591. <https://doi.org/10.2337/db11-0825>.
261. Stancill, J. S., Broniowska, K. A., Oleson, B. J., Naatz, A., & Corbett, J. A. (2019). Pancreatic β -cells detoxify H₂O₂ through the peroxiredoxin/thioredoxin antioxidant system. *Journal of Biological Chemistry*, 294(13), 4843–4853. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006219>.
262. Stoika, R., Kashchak, N., Lutsik-Kordovsky, M., Boyko, M., & Tsyrlunyk, A. (2001). In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 7(4), 652–658.
263. Subedi, L., Lee, J. H., Gaire, B. P., & Kim, S. Y. (2020). Sulforaphane Inhibits MGO-AGE-Mediated Neuroinflammation by Suppressing NF- κ B, MAPK, and AGE–RAGE Signaling Pathways in Microglial Cells. *Antioxidants*, 9(9), 792. <https://doi.org/10.3390/antiox9090792>.
264. Sudo, C., Ogawara, H., Saleh, A. W. H., Nishimoto, N., Utsugi, T., Ooyama, Y., Fukumura, Y., Murakami, M., Handa, H., Tomono, S., & Murakami, H. (2007). Clinical Significance of Neutrophil Apoptosis in Peripheral Blood of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Laboratory Hematology*, 13(3), 108–112. <https://doi.org/10.1532/LH96.07003>.
265. Sun, J., Cui, J., He, Q., Chen, Z., Arvan, P., & Liu, M. (2015). Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes☆. *Molecular Aspects of Medicine*, 42, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.01.001>.

266. Susag, L., Mathenge, S., & Benn, M. (2003). The alkaloids of two species of *Afrogaleta*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(6), 645–647. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00224-7).
267. Susana B. Genta, Cabrera, W. M., Grau, A., & Sánchez, S. S. (2005). Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43(11), 1657–1665. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.05.007>.
268. Suzuki, R., Iijima, M., Okada, Y., & Okuyama, T. (2007). Chemical Constituents of the Style of *Zea mays* L. with Glycation Inhibitory Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(1), 153–155. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.153>.
269. Szkudelski, T., & Szkudelska, K. (2015). Resveratrol and diabetes: From animal to human studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1145–1154. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.013>.
270. Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-Glucosidase and alpha-Amylase by Flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2), 149–153. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>.
271. Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F., & Tsuda, T. (2010). Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. *The Journal of Nutrition*, 140(3), 527–533. <https://doi.org/10.3945/jn.109.118216>.
272. Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M. B., & Olefsky, J. M. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine*, 18(9), 1407–1412. <https://doi.org/10.1038/nm.2885>.
273. Tanaka, M., Misawa, E., Ito, Y., Habara, N., Nomaguchi, K., Yamada, M., Toida, T., Hayasawa, H., Takase, M., Inagaki, M., & Higuchi, R. (2006). Identification of Five Phytosterols from Aloe Vera Gel as Anti-diabetic

- Compounds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(7), 1418–1422.
<https://doi.org/10.1248/bpb.29.1418>.
274. Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>.
 275. Torres, M., & Coates, T. D. (1999). Function of the cytoskeleton in human neutrophils and methods for evaluation. *Journal of Immunological Methods*, 232(1–2), 89–109. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00168-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00168-4).
 276. Upadhyay, H. C., Mishra, A., Pandey, J., Sharma, P., Tamrakar, A. K., Srivastava, A. K., Khan, F., & Srivastava, S. K. (2022). In vitro, In vivo and In silico Antihyperglycemic Activity of Some Semi-Synthetic Phytol Derivatives. *Medicinal Chemistry*, 18(1), 115–121.
<https://doi.org/10.2174/1573406417666201216124018>.
 277. Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>.
 278. Valentova, K., Lebeda, A., & Dolezalova, I. (2016). The biological and chemical variability of yacon. 54, 1347–1352.
 279. Valentová, K., Šeršeň, F., & Ulrichová, J. (2005). Radical Scavenging and Anti-Lipoperoxidative Activities of *Smallanthus sonchifolius* Leaf Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5577–5582.
<https://doi.org/10.1021/jf050403o>.
 280. Varshney, R., Gupta, S., & Roy, P. (2017). Cytoprotective effect of kaempferol against palmitic acid-induced pancreatic β -cell death through modulation of autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 448, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.033>.
 281. Velez, E., Castillo, N., Mesón, O., Grau, A., Bibas Bonet, M. E., & Perdígón, G. (2013). Study of the effect exerted by fructo-oligosaccharides from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root flour in an intestinal infection model with

- Salmonella Typhimurium. *British Journal of Nutrition*, 109(11), 1971–1979.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512004230>.
282. Venerando, B., Fiorilli, A., Croci, G., Tringali, C., Goi, G., Mazzanti, L., Curatola, G., Segalini, G., Massaccesi, L., Lombardo, A., & Tettamanti, G. (2002). Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients. *Blood*, 99(3), 1064–1070.
<https://doi.org/10.1182/blood.V99.3.1064>.
283. Vergun, O., Shymanska, O., Rakhmetov, D., Grygorieva, O., Ivanišová, E., & Brindza, J. (2020). Parameters of antioxidant activity of *Galega officinalis* L. and *Galega orientalis* Lam. (Fabaceae Lindl.) plant raw material. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 125–134. <https://doi.org/10.5219/1271>.
284. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-I](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I).
285. Vicente-Manzanares, M., & Sánchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Reviews Immunology*, 4(2), 110–122. <https://doi.org/10.1038/nri1268>.
286. Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61(3), 481–497.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.011>.
287. Wang, M., Cragger, M., & Pugazhenti, S. (2012). Modulation of Apoptosis Pathways by Oxidative Stress and Autophagy in β Cells. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/647914>.
288. Wang, Y., Yang, P., Yan, Z., Liu, Z., Ma, Q., Zhang, Z., Wang, Y., & Su, Y. (2021). The Relationship between Erythrocytes and Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/6656062>.

289. Watt, M. J., Miotto, P. M., De Nardo, W., & Montgomery, M. K. (2019). The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, 40(5), 1367–1393. <https://doi.org/10.1210/er.2019-00034>.
290. Wen, S., He, L., Zhong, Z., Zhao, R., Weng, S., Mi, H., & Liu, F. (2021). Stigmasterol Restores the Balance of Treg/Th17 Cells by Activating the Butyrate-PPAR γ Axis in Colitis. *Frontiers in Immunology*, 12, 741934. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.741934>.
291. Wiedemann, M., Gurrola-Díaz, C., Vargas-Guerrero, B., Wink, M., García-López, P., & Düfer, M. (2015). Lupanine Improves Glucose Homeostasis by Influencing KATP Channels and Insulin Gene Expression. *Molecules*, 20(10), 19085–19100. <https://doi.org/10.3390/molecules201019085>.
292. Willcox, A., Richardson, S. J., Bone, A. J., Foulis, A. K., & Morgan, N. G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 155(2), 173–181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x>.
293. Williams, M. A. (1977). Quantitative methods in biology. In *Practical Methods in Electron Microscopy*. – 1977 – Vol. 6 – P. 48-62. (Вип. 6).
294. Wu, H., & Ballantyne, C. M. (2020). Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research*, 126(11), 1549–1564. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315896>.
295. Xia, G., Zhu, T., Li, X., Jin, Y., Zhou, J., & Xiao, J. (2018). ROS-mediated autophagy through the AMPK signaling pathway protects INS-1 cells from human islet amyloid polypeptide-induced cytotoxicity. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9248>.
296. Yamagishi, S. (2011). Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental Gerontology*, 46(4), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.11.007>.
297. Yan, X., Suzuki, M., Ohnishi-Kameyama, M., Sada, Y., Nakanishi, T., & Nagata, T. (1999). Extraction and Identification of Antioxidants in the Roots of

- Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4711–4713. <https://doi.org/10.1021/jf981305o>.
298. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D. P., & Wang, X. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, 275(5303), 1129–1132. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1129>.
 299. Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>.
 300. Yeh, S. T. (2002). Using trapezoidal rule for the area under a curve calculation. *Proceedings of the Twenty-Seventh Annual SAS*. 27, 229–237.
 301. Yen, G.-C., & Chen, H.-Y. (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27–32. <https://doi.org/10.1021/jf00049a007>.
 302. Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., Richard, S., Quignard, J., Gross, R., Petit, P., Bataille, D., & Oiry, C. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology*, 161(4), 799–814. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00910.x>.
 303. Zarkovic, N., Cipak, A., Jaganjac, M., Borovic, S., & Zarkovic, K. (2013). Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of Proteomics*, 92, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.004>.
 304. Zganiacz, A., Santosuosso, M., Wang, J., Yang, T., Chen, L., Anzulovic, M., Alexander, S., Gicquel, B., Wan, Y., Bramson, J., Inman, M., & Xing, Z. (2004). TNF- α is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 401–413. <https://doi.org/10.1172/JCI18991>.

305. Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J. D., Yamamoto, M., & Takahashi, S. (2005). MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 4969–4976. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.4969-4976.2005>.
306. Zhang, Y., & Liu, D. (2011). Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *European Journal of Pharmacology*, 670(1), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.011>.
307. Zhao, Y., Sun, H., Li, X., Zha, Y., & Hou, W. (2018). Hydroxysafflor yellow A attenuates high glucose-induced pancreatic β -cells oxidative damage via inhibiting JNK/c-jun signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(2), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.036>.
308. Zhongmin M. (2012). The Role of Peroxidation of Mitochondrial Membrane Phospholipids in Pancreatic β -Cell Failure. *Current Diabetes Reviews*, 8(1), 69–75. <https://doi.org/10.2174/157339912798829232>.
309. Zhou, Z., Mahdi, A., Tratsiakovich, Y., Zahorán, S., Kövamees, O., Nordin, F., Uribe Gonzalez, A. E., Alvarsson, M., Östenson, C.-G., Andersson, D. C., Hedin, U., Hermes, E., Lundberg, J. O., Yang, J., & Pernow, J. (2018). Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(7), 769–780. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.052>.
310. Zhu, Y., Ren, C., Zhang, M., & Zhong, Y. (2020). Perilipin 5 Reduces Oxidative Damage Associated With Lipotoxicity by Activating the PI3K/ERK-Mediated Nrf2-ARE Signaling Pathway in INS-1 Pancreatic β -Cells. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 166. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00166>.
311. Zia, K., Ashraf, S., Jabeen, A., Saeed, M., Nur-e-Alam, M., Ahmed, S., Al-Rehaily, A. J., & Ul-Haq, Z. (2020). Identification of potential TNF- α inhibitors:

From in silico to in vitro studies. *Scientific Reports*, 10(1), 20974.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77750-3>.

ДОДАТОК

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті

1. **Клевета Г.** Дослідження біологічного ефекту екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis*) / Г. Клевета, А. Котик, М. Скибіцька, Я. Чайка, Н. Сибірна // 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. Сибірна // 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. Сибірна // 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. Сибірня // 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. Сибірня // 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. Сибірня // 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. Сибірня // 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 р53 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. Сибірня // 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 officinalis* Poir. & Endl.) / О. В. Горбулінська, М. Р. Хохла, Л. Т. Міщенко, **Г. Я. Гачкова**, Н. О. Сибірна // Біологічні Студії. – 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, **Н. Нachkova**, 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 (*Smalanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) 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. Nachkova, 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* Poepp. & 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*. – 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* Poepp. & 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.Nagalievska M. *Galega officinalis* extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes / Nagalievska 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.Nagalievska M. Functional activities of neutrophils in diabetic rats are changed by yacon extracts / M. Nagalievska, 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, **H. 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

26. Nagalievskaya 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

27. 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.

28. 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 симпозіумах, на яких
апробовано результати дисертації**

29. **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.
30. 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.
31. **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.
32. 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.

33. 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.
34. **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–
35. 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.
36. **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.
37. 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.

- 38.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 3'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р., Ялта : тези. – Ялта, 2012. – С. 94.
- 39.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.
- 40.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.
- 41.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.
- 42.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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Канюка О. Гіпоглікемічний ефект антоціанідинів капусти червонокачанної 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. **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.
52. Дашченко А. Створення фітопрепаратів на основі *Smallanthus sonchifolius* (Роепп. & Endl., Н. Robinson) / А. Дашченко, 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.

53. 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.
54. 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.
55. **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.
56. **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.
57. Фуртак Х. Вплив екстракту козлятника лікарського на процеси глікації та окисної модифікації білків за умов стрептозоточин-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.

- 58.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.
- 59.**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.
- 60.Бугрин М. Б., **Гачкова Г. Я.**, Глущенко 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.
- 61.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.