МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

ЛУПАК Мар'яна Ігорівна

УДК 591.111.1:576.37:615.322

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ АНТИДІАБЕТИЧНОЇ ДІЇ ЕКСТРАКТУ ГАЛЕГИ ЛІКАРСЬКОЇ (*GALEGA OFFICINALIS* L.)

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2015

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, доцент
ГАЧКОВА Галина Ярославівна,
Львівський національний університет
імені Івана Франка,
доцент кафедри біохімії.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
ЛУЩАК Володимир Іванович,
Прикарпатський національний
університет імені Василя Стефаника,
завідувач кафедри біохімії та біотехнології;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
КІТ Юрій Ярославович,
Інститут біології клітини
Національної академії наук України
завідувач лабораторії молекулярних механізмів
міжклітинних взаємодій.

Захист відбудеться "__" _____ **2016 р**. о ___ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка, ауд. **333**.

Поштова адреса: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, Львівський національний університет імені Івана Франка, спеціалізована вчена рада К 35.051.14.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий "__" _____ **2015 р**.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради **О. В. Іккерт**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Згідно сучасних наукових поглядів, гіперглікемія, в результаті якої посилюються процеси, що опосередковують порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, є основним патогенетичним чинником виникнення діабетичних ускладнень [Brownlee M., 2005; Pacher P. et al., 2007; Дрель В., 2010]. У разі хронічної гіперглікемії відбувається надмірне накопичення продуктів неферментативного глікозилювання в клітинах організму, активується низка метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого зростає утворення активних форм оксигену (АФО) й нітрогену (АФН), і, в цілому, посилюються процеси, які можуть бути охарактеризовані як оксидативно-нітративний стрес [Lee H. et al., 2003; Brownlee M., 2005; Drel V., 2010]. У свою чергу, інтенсифікація оксидативно-нітративного стресу при цукровому діабеті (ЦД) спричинює модифікацію протеїнів, активацію сигнальних шляхів, запальних процесів, що сприяє загибелі клітин у багатьох тканинах живих організмів і є характерним для обох його типів [Maiese K. et al., 2007; Morgan M. et al., 2011; Дрель В., 2010].

Реакція організму на розвиток запального процесу проявляється стимуляцією кровотворення, виходом лейкоцитів з резервного пулу кісткового мозку у кров та їхньою міграцією з крові у вогнище запалення. Ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності цих клітин є процеси реорганізації актинового цитоскелету в результаті полімеризації – деполімеризації актину [Ballestrem C. et al., 1998; Bugyi B. et al., 2010; Pollard T., 2007; Samstag Y. et al., 2003]. Порушення процесів полімеризації актину при активації лейкоцитів призводить до зниження функціональної активності фагоцитів, що проявляється розвитком інфекційно-запальних процесів [Alba-Loureiro T. et al., 2007].

Лікування ЦД є надзвичайно складною проблемою, вирішення якої потребує комплексних підходів з метою запобігання розвитку метаболічних, структурних та функціональних порушень в організмі. На даний час існує багато препаратів для лікування ЦД, однак немає жодних ліків, які б пройшли клінічні випробування на предмет коректної, без побічних дій можливості усувати наслідки оксидативно-нітративного стресу на організм людини, що є однією з головних проблем у лікуванні ускладнень цього захворювання.

Актуальним є пошук принципово нових за механізмом дії антидіабетичних препаратів, які знижуватимуть рівень глікемії й інсулінорезистентність, сприятимуть відновленню інсуліноутворюючої функції підшлункової залози та нівелюватимуть шкідливі для організму прояви оксидативно-нітративного стресу, який розвивається за ЦД. З цієї точки зору актуальними є дослідження антидіабетичної дії лікарських рослин, які завдяки багатокомпонентному складу можуть виявляти позитивний вплив на обмін глюкози, збалансовувати прооксидантно-антиоксидантну рівновагу та запобігати окисному ушкодженню різних компонентів клітини.

Перспективною рослинною сировиною, яку можна використати для розробки антидіабетичних фітопрепаратів є *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський, галега лікарська). Ця рослина широко застосовується у народній медицині, але високий вміст алкалоїдів робить її непридатною для використання у терапевтичних

кількостях. Використовуючи метод фракціонування екстракту галеги лікарської з метою видалення токсичних алкалоїдів [Сибірна Н. та ін., 2015] було отримано фракцію, збагачену компонентами, що потенційно мають гіпоглікемічну та антиоксидантну дію і є не токсичними.

Дослідження механізмів протекторного впливу безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської (БФЕГЛ) на клітини крові та підшлункової залози при ЦД є пріоритетними та актуальними, а отримані результати можуть сприяти розробці нових підходів у створенні фітопрепаратів з гіпоглікемічною та антиоксидантною дією.

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 темою: "Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської" (№ держреєстрації 0110U003147).

Робота була виконана за фінансової підтримки Західно-Українського Біомедичного Центру (індивідуальний грант "The influence of alkaloid-free fraction of *Galega officinalis* extract on the rats mononuclear leukocytes apoptosis under the experimental diabetes mellitus type 1", 2014–2015 рр.) та Державного фонду фундаментальних досліджень і Білоруського республіканського фонду фундаментальних досліджень (проект "Молекулярні механізми антидіабетиної дії препаратів рослинного походження" Ф 54.4/017 (№ держреєстрації 0113U005313), 2013-2014 рр.).

Мета та завдання досліджень. Метою даної роботи було дослідження біохімічних ефектів дії БФЕКЛ на структурно-функціональний стан лейкоцитів та β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози щурів за ЦД, індукованого введенням стрептозотоцину.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Стабілізувати БФЕГЛ застосовуючи біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР), що синтезуються бактеріями *Pseudomonas* sp. PS-17 та дослідити компонентний склад цього екстракту.
2. Дослідити гіпоглікемічну дію БФЕГЛ стабілізованої біокомплексом PS-17 (далі по тексту – E^{ps}) та її вплив на структурно-функціональний стан клітин острівцевого апарату підшлункової залози у нормі та за ЕЦД.
3. З'ясувати вплив E^{ps} на показники, що характеризують ступінь розвитку оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за ЕЦД.
4. Дослідити вплив E^{ps} на кількість лейкоцитів периферичної крові щурів з ознаками апоптозу у контрольних тварин та тварин з ЕЦД.
5. Вивчити рівень проліферації клітин-попередників лейкоцитів у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення E^{ps}.
6. Дослідити процес полімеризації актину у лейкоцитах периферичної крові за досліджуваних умов.

***Об'єкт дослідження*:** молекулярні механізми коригуючого впливу E^{ps} на рівень глікемії, порушення структурно-функціонального стану лейкоцитів та острівцевих клітин підшлункової залози за ЕЦД.

Предмет дослідження: гіпоглікемічна дія E^{ps}, структурно-функціональний стан β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, оксидативно-нітративний стрес,

процес полімеризації актину, рівень проліферації клітин-попередників лейкоцитів та кількість лейкоцитів з ознаками апоптозу.

Методи дослідження: біохімічні, молекулярно-біологічні, цитологічні, імуноцитохімічні, гістологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Проведено стабілізацію БФЕГЛ додаванням біо-ПАР, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17 у концентрації 3,3 г/л до вихідної суміші екстракту. Методом газової хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад E^{ps} та виявлено 31 сполуку, з них ідентифіковано 26. Серед них вищі жирні кислоти та їх естери (63,90 % від суми усіх сполук), фітостероли (17,30 %), тритерпени (2,27 %), дитерпени (5,60 %), флавоноїди (2,89 %) та вітамін Е (0,46 %). З'ясовано, що домінуючими компонентами є жирні кислоти та їх естери, основну частину з яких складають етиловий естер пальмітинової кислоти та метиловий естер ліноленової кислоти.

Встановлено виражену гіпоглікемічну дію E^{ps}. Вперше показано, що введення E^{ps} призводить до підвищення концентрації інсуліну та С-пептиду в плазмі крові та виявляє цитопротекторний вплив на інкреторний апарат підшлункової залози у щурів за ЕЦД. Доведено, що E^{ps} нівелює прояви оксидативно-нітративного стресу за ЕЦД завдяки здатності компонентів, які є у його складі інактивувати вільні радикали та запобігати інгібуванню ключових ферментів антиоксидантної системи (АОС) – супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонпероксидази (ГПО). Продемонстровано зменшення кількості лейкоцитів з ознаками апоптозу при введенні E^{ps} тваринам з ЕЦД, що свідчить про пригнічуючий вплив екстракту на процес апоптозу лейкоцитів, інтенсивність якого значно підвищується за умов діабету. Виявлено стимуляцію проліферації та диференціації клітин попередників лейкоцитів на фоні зростання вмісту фактора некрозу пухлин - α (ФНП-α) за досліджуваної патології. Вперше підтверджено, що у разі введення E^{ps} тваринам зі стрептозотоциновим діабетом знижується рівень проліферації клітин-попередників білого ростка кісткового мозку і вміст ФНП-α у плазмі крові щурів. Вперше проведено дослідження процесу полімеризації актину в лейкоцитах щурів за ЕЦД та на фоні введення E^{ps}. Встановлено, що на фоні підвищення загального рівня F-актину у лейкоцитах тварин з ЕЦД зменшується кількість актинових філаментів цитоскелету, водночас зростає вміст коротких філаментів актину (субмембранний актин). Полімеризація субмембранного актину свідчить про підвищення міграційної здатності цих клітин. Введення E^{ps} хворим на діабет тваринам виявляє коригуючий вплив на полімеризацію актину в лейкоцитах.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено спосіб отримання фітопрепарату на основі БФЕГЛ**.** Комплексні дослідження біологічних ефектів впливу E^{ps} на лейкоцити та острівцевий апарат підшлункової залози здорових щурів та тварин з ЕЦД підтверджують його антидіабетичну дію. E^{ps} виявляє виражену гіпоглікемічну дію, сприяє збільшенню кількості функціонально-повноцінних β-клітин острівців Лангерганса, коригує порушення структурно-функціонального стану лейкоцитів та пригнічує апоптотичну загибель цих клітин. Отримані дані вказують на доцільність пошуку і розробки на основі E^{ps} нових фармакологічних препаратів для лікування ЦД не лише 2-го, але й 1-го типу зважаючи на його здатність виявляти

цитопротекторний вплив на острівцевий апарат підшлункової залози, що є особливо актуальним.

Наведені у дисертаційній роботі дані впроваджені у навчальний процес під час викладання спецкурсів: „Біохімія крові” та „Функціональна біохімія”, які читаються на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом спільно з науковим керівником – к.б.н., доцентом Г. Я. Гачковою розроблено план дослідження, проведено інтерпретацію та узагальнення результатів, а також формулювання основних положень, які виносяться на захист, і висновків дисертаційної роботи. Пошук та аналіз наукової літератури згідно теми кандидатської дисертації, виконання експериментальної частини роботи, статистичне опрацювання результатів та написання дисертаційної роботи виконано безпосередньо здобувачем. Збір сировини галеги лікарської здійснено за участю ст.н.сп. відділу природної трав’яної флори Ботанічного саду ЛНУ імені Івана Франка М. І. Скибіцької.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на IX, X, XI міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013, 2014, 2015); VII Львівсько-Люблінській конференції “Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії” (VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry, Львів, 2013); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів 2014), а також на наукових семінарах кафедри біохімії біологічного факультету та щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 робіт, у тому числі 6 статей у фахових наукових журналах і 6 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та з’їздах.

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 із 227 найменувань. Основна частина роботи викладена на 150 сторінках, ілюстрована 26 рисунками і 7 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасні уявлення про біохімічні механізми розвитку оксидативно-нітративного стресу при ЦД та охарактеризовано роль апоптозу в патогенезі цього захворювання. Охарактеризовано механізми хемотаксису лейкоцитів та проаналізовано особливості реорганізації актинового цитоскелету як головного інструменту і механізму для активного переміщення клітин. Значну увагу приділено аналізу молекулярних механізмів антидіабетичної дії субстанцій наявних у складі лікарських рослин.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження були проведені на білих безпородних щурах віком 4–5 місяців, з масою тіла 110–150 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з дотриманням загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах згідно з „Загальними принципами роботи на тваринах”,

затвердженими І 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). ЕЦД індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину (Sigma, США) з розрахунку 5,5 мг (у 10 мМ цитратному буфері, pH 5,5) на 100 г маси тіла тварини. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, яку визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів “Філісіт-Діагностика”, Україна. Для експерименту використовували тварин з рівнем глюкози 15 ммоль/л і вище (після 18-годинного голодування). Через два тижні після індукції ЦД, тваринам раз на добу *per os* вводили E^{ps} у вигляді водної емульсії, у дозі 0,6 та 1,2 г на 1 кг маси тіла тварини, в об’ємі 1 мл води впродовж 14 діб. Оптимальну дозу досліджуваного екстракту визначали виходячи з літературних даних [Лапиніна Л. та ін., 1961] та власних експериментальних досліджень [Клевета Г. та ін., 2009]. Тварин було поділено на групи: *перша* – контроль; *друга* – здорові тварини, яким впродовж 14 днів *per os* через зонд вводили E^{ps}; *третя* – тварини ЕЦД; *четверта* – тварини з ЕЦД, яким вводили досліджуваний екстракт за вищезазначеною схемою.

Одержання БФ ЕГЛ здійснювали за схемою розробленою на кафедрі біохімії ЛНУ імені Івана Франка [Хохла М., 2012]. Для стабілізації досліджуваного екстракту використовували біоПАР PS-17, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України [Сибірна Н., та ін. 2015]. Компонентний склад E^{ps} визначали за допомогою хроматографа Agilent Technology 6890N з масспектрометричним детектором 5979B.

Глюкозотолерантний тест (ГТТ) проводили вранці після 18-годинного голодування тварин. Навантаження глюкозою здійснювали шляхом перорального введення її розчину у розрахунку 1 г на 1 кг маси тіла. Площу під глікемічними кривими (*AUCglu - area under a curve*) розраховували за допомогою правила трапецій [Yeh S., 2002].

Фракціонування та морфологічні дослідження клітин кісткового мозку та визначення концентрації глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) виконували згідно з методами описаними Н. Сибірною та співавт., 1997. Вміст інсуліну, С-пептиду та ФНП-α у плазмі крові та проліферативну активність клітин білого ростка кісткового мозку визначали імуноферментним методом згідно інструкцій фірм-виробників застосовуючи стандартні набори ELISA (Sigma, США та Millipore, США). Гістологічне дослідження підшлункової залози здійснювали згідно методик [Коржевский Д., 2010; Саркисов Д., 1996; Меркулов Г., 1969]. Дослідження препаратів підшлункової залози проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus CX-41, оснащеного цифровою фотокамерою Olympus (Японія). Морфометричний аналіз острівцевого апарату підшлункової залози проводили використовуючи комп’ютерну програму ImageJ (NIH, США).

Загальну фракцію лейкоцитів виділяли у градієнті густини фікол-тріомбраст (ρ = 1,076–1,078 г/см^3) [Boyum A., 1968]. Продукцію АФО в лейкоцитах крові вимірювали використовуючи 2′,7′-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетат (Fluka, Німеччина), який після окиснення перетворювався у флуоресціюючий 2′,7′-дихлорфлуоресцеїн.

Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали згідно з методикою [Чевари С. и др., 1991], каталази (КФ 1.11.1.6) – [Королюк М. и др., 1988], ГПО (КФ 1.11.1.9) – [Моин В., 1986]. Вміст ТБК-позитивних продуктів визначали згідно методики

[Тимирбулатов Р. и др., 1981], вміст карбонільних груп білків [Мещишин І., 1999]. Концентрацію L-аргініну визначали за допомогою реакції Сакагучі [Dawson J., 1998]. Сумарну активність NO-синтази (КФ 1.14.13.39) визначали модифікованим мікропланшетним методом [Dawson J. and Knowles R., 1998]. Вміст нітрит- та нітрат-аніонів визначали з використанням реактиву Гріса [Miranda K. et al., 2001]. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [Lowry O., 1951].

Визначення вмісту полімеризованого актину здійснювали методом протокової цитометрії з використанням фалоїдину міченого ТРІТЦ [Burns S. et al., 2010]. Фракціонування лізатів лейкоцитів з метою розділення фракцій, що містять довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі філаменти та мономери актину здійснювали за модифікованою методикою [Kwiatkowska K., 2003]. Вестерн-блот аналіз проводили згідно стандартного протоколу [Towbin H. et al., 1992]. Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору для посиленої хемілюмінесценції (Millipore, США). Денситометричний аналіз результатів імуноблотингу здійснювали за допомогою програми Gelpro32. Детекцію вмісту проапоптичного білка p53 і антиапоптичного білка Bcl-2 здійснювали непрямим імунопероксидазним методом [Беркало Л. та ін., 2003]. Дослідження кількості клітин з ранніми та пізніми ознаками апоптозу проводили методом проточної цитометрії застосовуючи подвійне флуоресцентне фарбування клітин анексином V міченим ФІТЦ та пропідій йодидом (ПЙ).

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Стабілізація БФЕГЛ за допомогою біоПАР, які синтезують бактерії *Pseudomonas sp*. PS-17 та її компонентного складу. Для отримання стабільних емульсій БФ ЕГЛ нами було підібрано низку концентрацій (0,6, 2,0 і 3,3 г/л) біокомплексу PS-17 (суміш рамноліпідів і полісахаридів). Ефективність емульгування зростала зі збільшенням концентрації біокомплексу PS-17 до 3,3 г/л. Застосування біоПАР у концентрації 3,3 г/л дало змогу отримати дрібнодисперсну емульсію зі середнім розміром крапель менше 1 мкм, кількість яких становить до 80 %. Така емульсія є стійкою і не розшаровується понад 30 діб.

В результаті проведеного хромато-мас-спектрометричного визначення складу досліджуваного екстракту було ідентифіковано 27 компонентів, а саме: вищі жирні кислоти та їхні ефіри (63,90 %), монотерпен – лоліолід (1,43 %), дитерпени – неофітадієн (1,93 %) і фітол (3,68 %), тритерпени – сквален (0,34 %) і α-амірин (1,93 %), фітостероли – кампестерол (1,97 %), стігмастерол (14,73 %) та 4,14,-диметил-, (3.β,4.α,5.α.)-9,19-циклоергост-24(28)-єн-3-ол (0,65 %), флавоноїди (2,98 %) та вітамін Е (0,46 %).

Дослідження гіпоглікемічної дії E^{ps} та її впливу на структурно-функціональний стан β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози у нормі та за ЕЦД. Аналіз отриманих результатів показав, що при введенні *per os* E^{ps} контрольним тваринам вміст глюкози та HbA1c у крові щурів практично не змінювався. Водночас встановлено виражену гіпоглікемічну дію E^{ps} за умов ЕЦД –

зниження концентрації глюкози (на 37 %) та HbA1c (на 41 %) порівняно з діабетом до значень фізіологічної норми (рис. 1.). Антигіперглікемічну дію E^{ps} також оцінювали за здатністю знижувати рівень глюкози на максимумі розвитку гіперглікемії після навантаження глюкозою. Як критерій сумарної відповіді на стандартний глюкозотолерантний тест розраховували інтегральний показник глікемії *AUCglu*, який відображає загальне підвищення концентрації глюкози після введення цього моносахариду та досліджуваного екстракту. Застосування E^{ps} сприяло підвищенню толерантності до глюкози. Це зумовило значуще зменшення *AUCglu* у контрольних та хворих на діабет тварин на 25% і 47% відповідно.

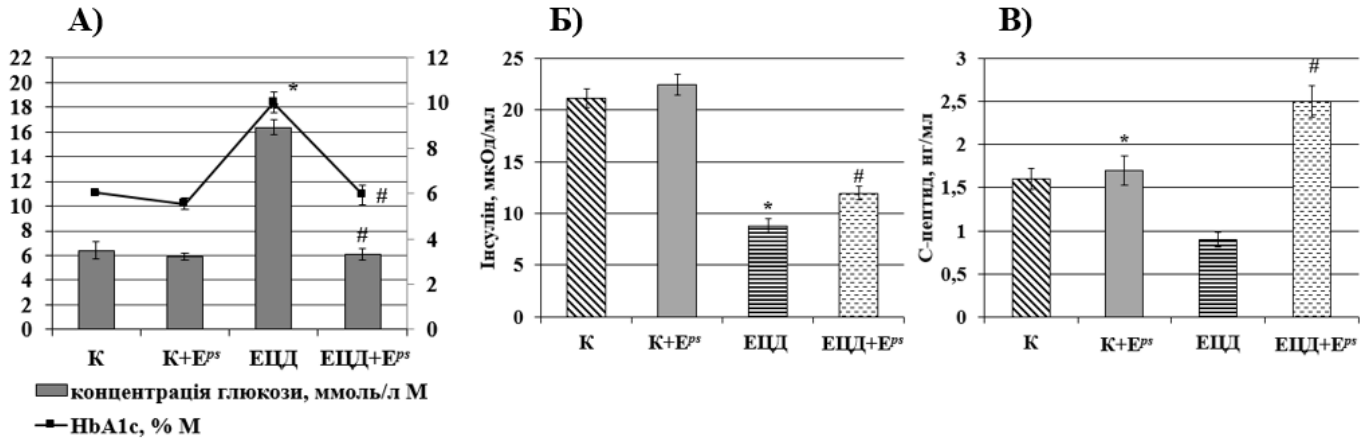

Рис. 1. Вплив E^{ps} на вміст глюкози й глікозильованого гемоглобіну (**А**), інсуліну (**Б**) та С-пептиду (**В**) у нормі та за умов ЕЦД (M±m, n = 5-10)

Примітка: тут і далі *– різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05;

– різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P < 0,05.

Аналізуючи компонентний склад досліджуваного екстракту можна припустити, що цукрознижувальна дія зумовлена наявністю у його складі фітолу [Elmazar M. et al., 2013], естерів пальмітинової кислоти [Sarkodie J. et al., 2013], α-амірину [Santos F. et al., 2012] та фітостеролів [Tanaka M. et al., 2006] або їхньою синергічною дією.

Для обгрунтування механізмів гіпоглікемічної дії нами було проведено морфометричне дослідження острівців Лангерганса підшлункової залози та здійснено оцінку функціональної активності β-клітин за показниками концентрації інсуліну та С-пептиду в плазмі крові щурів у разі діабету.

За ЕЦД продемонстровано ураження інкреторного апарату підшлункової залози. Відмічено нерівномірне розміщення острівців Лангерганса, а в окремих часточках повну їхню відсутність. В результаті морфометричних досліджень встановлено, що кількість панкреатичних острівців на стандартній одиниці площі зменшилась у 3,6 рази порівняно з контролем. У секреторних клітинах острівців Лангерганса виявлено дегенеративні процеси: вакуолізація цитоплазми, вогнища некрозу, деформація ядер, нечіткість границь клітин. Кількість β-клітин і їх секреторних гранул різко знижувалася (рис. 2, Г). У разі введення діабетичним тваринам E^{ps} у дозі 0,6 г/кг маси тіла виявлено незначне збільшення кількості острівців Лангерганса на стандартній площі зрізу, їх середньої площі, діаметру, об’єму та кількості β-клітин щодо діабету (рис. 2, Д). Натомість встановлено більш виражену цитопротекторну дію цього екстракту при введенні його у дозі 1,2 г/кг маси тіла,

про що свідчить статистично достовірне збільшення показника щільності розташування острівців Лангерганса (на 72,2%), їх 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 дегрануляції (рис. 2, Е).

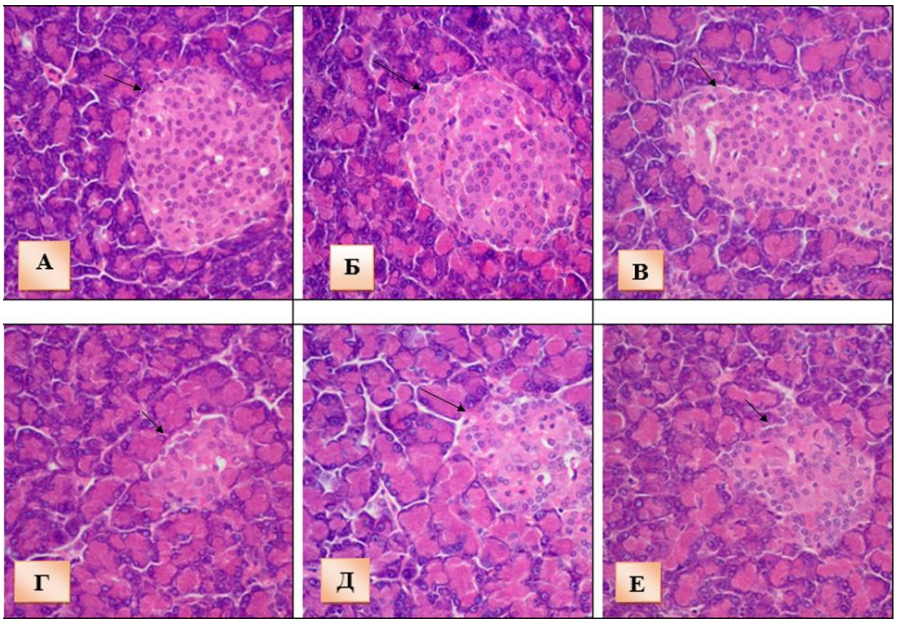

Рис. 2. Морфологічна структура підшлункової залози. Стрілками показано острівці Лангерганса.

А – Контроль;

Б – Контроль+E^{ps} в дозі 0,6 г/кг;

В – Контроль+E^{ps} у дозі 1,2 г/кг;

Г – ЕЦД;

Д – ЕЦД + E^{ps} у дозі 0,6 г/кг;

Е – ЕЦД + E^{ps} в дозі 1,2 г/кг;

Фарбування гематоксилін – еозином. Збільшення 40х10.

При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози щурів контрольної групи і тварин, яким вводили E^{ps} не виявлено змін у структурній організації β-клітин підшлункової залози (рис. 2, Б-В). Протекторний вплив E^{ps} на острівцевий апарат підшлункової залози у разі діабету підтверджують дослідження, які вказують на підвищення концентрації С-пептиду (у 2,2 рази) та інсуліну (в 1,7 рази) у плазмі крові порівняно з діабетом.

Ми припускаємо, що цитопротекторний вплив E^{ps} на β-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози значною мірою може реалізуватися завдяки здатності компонентів, які містяться у його складі пригнічувати прояви оксидативно-нітративного стресу. Адже основні шляхи руйнування бета-клітин при цукровому діабеті 1 типу опосередковуються дією АФО й АФН.

Вплив E^{ps} на прояви оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД. Розвиток ЕЦД супроводжувався підвищенням базального рівня продукції АФО (у 3,7 рази) у лейкоцитах щурів (рис. 3).

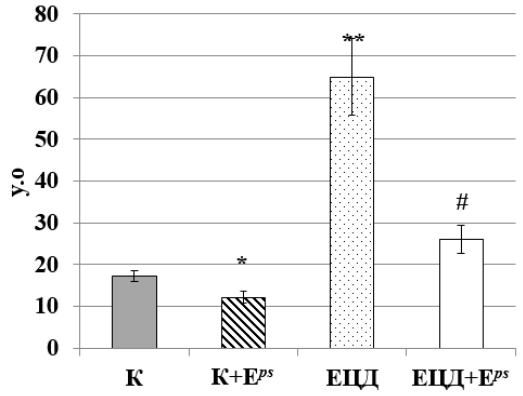

Рис. 3. Рівень генерації АФО у лейкоцитах периферичної крові щурів

Також у разі ЕЦД встановлено підвищення активності NO-синтази у 1,6 разів та вмісту стабільних метаболітів NO – нітрит- та нітрат-аніонів (у 1,6 та 3,8 рази відповідно) порівняно з показниками тварин контрольної групи (табл. 1). Отримані результати свідчать про розвиток оксидативно-нітративного стресу за даної патології.

Надпродукція АФО та АФН призводила до інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення біосубстратів, про свідчить зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів (в 2,6 рази) та продуктів окисної модифікації білків нейтрального та основного характеру (у 2,3 та 3,4 рази відповідно) у лейкоцитах тварин з ЕЦД.

Таблиця 1

Вплив E^{ps} на активність NO-синтази та вміст нітрит- і нітрат-аніонів в лейкоцитах щурів у нормі та за умов ЕЦД (М ± м, n = 10–14)

Умови експерименту	Вміст NO^{2-}, мкмоль/мг білка	Вміст NO^{3-}, мкмоль/мг білка	Активність NO-синтази, нмоль NO^{2-}/ хв мг білка
К	0,45±0,043	17,76±3,75	6,99±1,09
К+E^{ps}	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 +E^{ps}	0,54±0,059	49,07±5,83#	8,45±0,48#

Аналіз отриманих результатів показав зниження активності ключових ферментів антиоксидантного захисту – СОД (на 22,37%), каталази (на 20,53%) та ГПО (на 38,8%) у лейкоцитах за ЕЦД (табл. 2). Ці експериментальні дані підтверджують неспроможність АОС лейкоцитів реалізувати у повному обсязі захисні та адаптаційні механізми у разі оксидативно-нітративного стресу, який виникає за досліджуваної патології.

Таблиця 2

Активність окремих ферментів АОС у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні E^{ps} (М ± м, n = 5–7)

Умови експерименту	Активність СОД, U/мг білка	Активність каталази, нмоль H_2O_2/ хв×мг білка	Активність ГПО, мкмоль G-SH/хв×мг білка
К	266,0±23,5	3,46±0,2	49,9±1,0
К+E^{PS}	266,5±14,6	4,3±0,2*	66,1±1,8*
ЕЦД	206,5±24,8*	2,75±0,2*	30,5±1,7*
ЕЦД+E^{PS}	390,1±26,7#	3,59±0,2#	36,1±2,6

Введення E^{ps} попереджає розвиток оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах щурів за стрептозотоцинового діабету забезпечуючи мобілізацію антиоксидантних механізмів захисту. Досліджуваний екстракт пригнічує утворення АФО і проявляє інгібуючу дію на активність NO-синтази знижуючи надпродукцію NO у лейкоцитах, знижує інтенсивність процесів окисної модифікації білків та ліпідів, а також сприяє підвищенню активності ферментів антиоксидантної системи захисту. У групі здорових тварин антиоксидантна дія досліджуваного екстракту виражена у меншій мірі, ніж за умов ЕЦД.

Ми припускаємо, що біологічно активні компоненти E^{ps}, які мають потенційні антиоксидантні властивості, запобігають розвитку оксидативно-нітративного стресу за ЕЦД інактивуючи вільні радикали та запобігаючи інгібуванню ключових компонентів ензиматичної ланки АОС.

Вплив E^{ps} на кількість лейкоцитів периферичної крові щурів з ознаками апоптозу у нормі та за умов ЕЦД. У разі ЕЦД встановлено збільшення вмісту білка p53 та зниження вмісту білка Bcl-2 у лейкоцитах периферичної крові щурів, про що свідчить збільшення кількості $p53^{+}$-позитивних клітин та зниження кількості $Bcl\text{-}2^{+}$- та $Bcl\text{-}2^{++}$-позитивних клітин. Виявлений дисбаланс кількісного співвідношення білків-регуляторів апоптозу є ознакою посилення апоптичних процесів у лейкоцитах за ЕЦД (рис. 4).

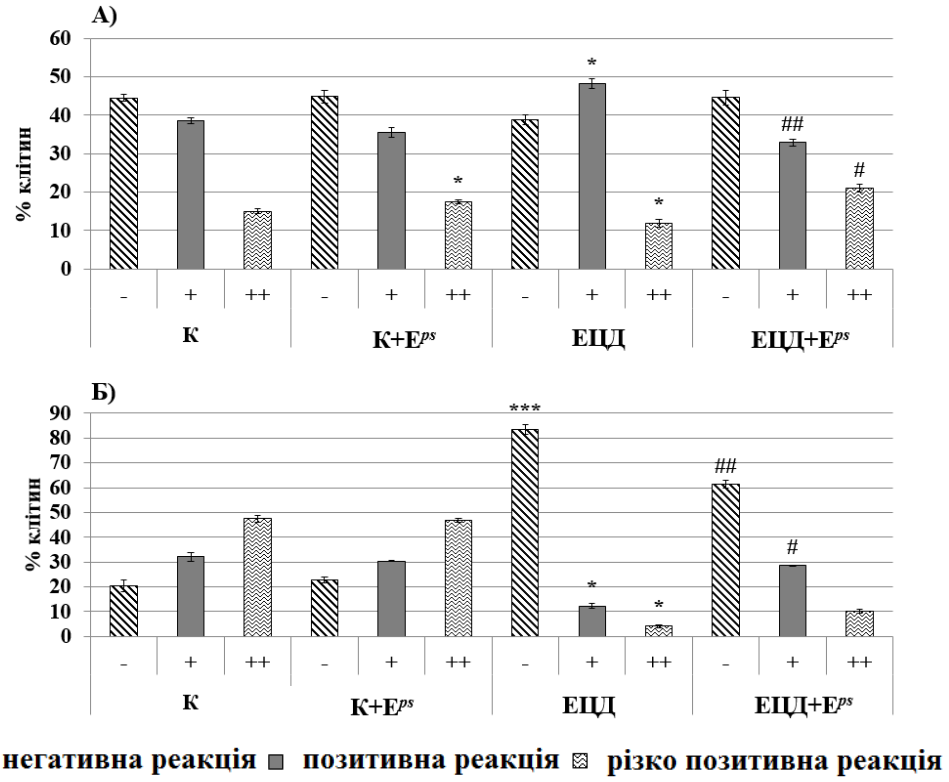

Рис. 4. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту у цих клітинах проапоптичного (p53) (**А**) та антиапоптичного (Bcl-2) білків (**Б**) у нормі, за ЕЦД і на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

Методом протокової цитуфлоуриметрії із застосуванням подвійного флуоресцентного фарбування лейкоцитів анексином V міченим ФІТЦ та пропідій

йодидом було досліджено кількісне співвідношення клітин із ранніми та пізніми ознаками апоптозу, а також із ознаками некрозу. З'ясовано, що за умов ЕЦД збільшується кількість анексин-позитивних клітин (у 3,8 рази) та кількість анексин-позитивних клітин, які давали також позитивну реакцію при фарбуванні пропідій йодидом (у 2,7 рази) (табл. 3).

Таблиця 3

Дослідження кількості апоптичних лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі, за ЕЦД та на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± м, n = 5–7)

	Живі клітини (Анексин V^-/ПЙ, %)	Клітини з ранніми ознаками апоптозу (Анексин V^+/ПЙ$^-$, %)	Клітини з пізніми ознаками апоптозу (Анексин V^+/ПЙ$^+$, %)	Клітини з ознаками некрозу (Анексин V^-/ПЙ$^+$, %)
К	96,41±1,7	2,75±1,92	0,06±0,02	0,78±0,30
К+E^{ps}	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*	1,91± 1,76
ЕЦД+E^{ps}	98,12±0,26$^{\#}$	1,39±0,31$^{\#}$	0,04 ± 0,01$^{\#}$	0,44±0,07$^{\#}$

У тварин контрольної групи, яким вводили E^{ps} не відмічено статистично вірогідних змін вмісту білків p53 і Bcl-2 у лейкоцитах, однак виявлено зниження кількості анексин-позитивних клітин. Натомість у разі введення цього екстракту тваринам з ЕЦД виявлено коригуючий вплив на вміст про- (p53) і антиапоптичного (Bcl-2) білків у лейкоцитах та кількість клітин із ранніми та пізніми ознаками апоптозу. Антиапоптична дія досліджуваного екстракту може бути зумовлена наявністю у його складі компонентів з антиоксидантними властивостями, оскільки багаточисельними дослідженнями доведено захисний ефект антиоксидантів у процесі апоптозу [Salganik R., 2001], а також α-ліноленової кислоти та її естерів, які здатні знижувати прояви апоптозу індукованого високою концентрацією глюкози [Yu Y. et al., 2002; Хохла М. та ін., 2013].

Вплив E^{ps} на проліферативну активність попередників лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД. Вплив E^{ps} на процеси проліферації і диференціації клітин-попередників лейкоцитів оцінювали досліджуючи рівень включення у проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину методом імуноферментного аналізу та проаналізуваши морфологічний склад клітин білого ростка кісткового мозку в контрольних тварин і тварин з ЕЦД. Показано зростання рівня проліферації попередників лейкоцитів на фоні підвищення концентрації ФНП-α за ЕЦД (рис. 5-6). Аналіз мієлограми вказує на збільшення кількості лімфобластів за цих умов. Отримані дані свідчать про стимуляцію лейкопоезу. Посилення проліферативної активності кістковомозкових попередників лейкоцитів за ЕЦД може бути компенсаторною реакцією організму, що виникає у відповідь на зниження кількості лейкоцитів периферичної крові в результаті інтенсифікації апоптозу.

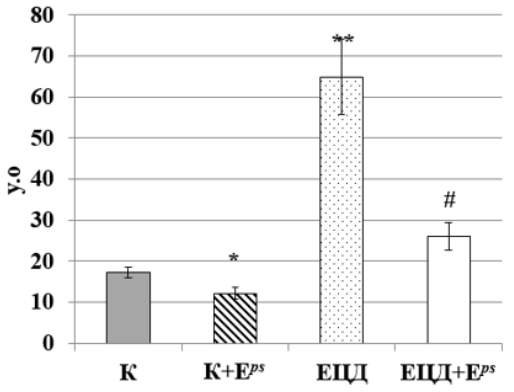

Рис .5. Рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину у нормі, за ЕЦД і на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

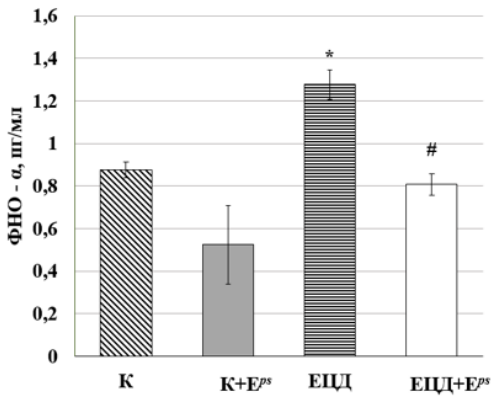

Рис. 6. Вміст ФНП–α у плазмі крові щурів у нормі, за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

У разі введення E^{ps} тваринам контрольної групи кількість лімфобластів та рівень включення аналога тимідину у проліферуючі клітини не змінювалися. Натомість застосування екстракту призводило до зниження кількості лімфобластів у тварин з ЕЦД, що узгоджується з результатами імуноферментного аналізу, які характеризують рівень проліферативної активності клітин білого ростка кісткового мозку.

Дослідження процесу полімеризації актину у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення E^{ps}. Високий рівень глюкози у крові спричиняє виникнення запальних процесів, на що в першу чергу реагують клітини крові, зокрема лейкоцити. Рух лейкоцитів у лімфоїдній системі, руслі крові та вихід у периферичні тканини визначає важливість цих клітин для розвитку імунної відповіді за всіх патологій, а особливо при аутоімунних процесах, до яких належить цукровий діабет 1-го типу [Фултон А., 1987; Сибірна Н., та ін. 2011]. Процес полімеризації актину є в основі механізмів формування стресових фібрил, утворення ламелоподій і філоподій, тобто у зміні морфо-функціонального стану клітини, узалежненого від білків цитоскелету. Тому, на наступному етапі досліджень ми вивчали вплив БФЕГЛ на процес полімеризації актину, як основу локомоторної функції лейкоцитів.

Методом протокової цитометрії із застосуванням фалоїдину міченого флуоресцентним барвником ТРІТЦ встановлено зростання вмісту F-актину в лейкоцитах щурів у разі ЦД 1-го типу (рис. 7), що вказує на зміну структурно-функціональних властивостей і преактивований стан цих клітин. Преактивований стан лейкоцитів характеризується формуванням на поверхні клітини значної кількості коротких псевдоподій. F-актин локалізується у псевдоподіях, ламелоподіях, складках мембрани, а також субмембранному шарі [Hannigan M. et al., 2001]. При введенні E^{ps} тваринам з ЕЦД вміст F-актину в лейкоцитах достовірно знижувався, проте перевищував контрольні значення.

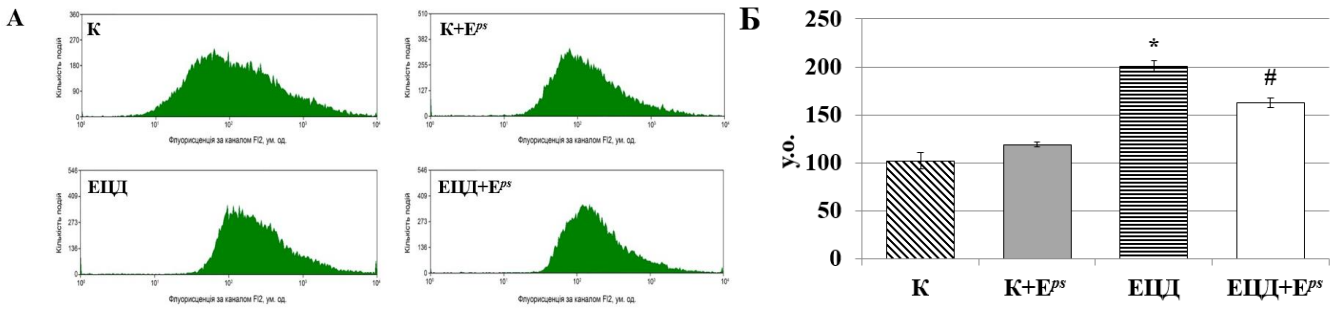

Рис. 7. Гістограми інтенсивності флуоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ у лейкоцитах периферичної крові щурів (**А**); Оцифровані дані гістограм, що відображають рівень полімеризованого актину у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флуоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ (**Б**)

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 E^{ps}. На рис. 8. наведено оцифровані результати імуноблот-аналізу фракцій актинових філаментів цитоскелету, коротких філаментів і мономерів актину.

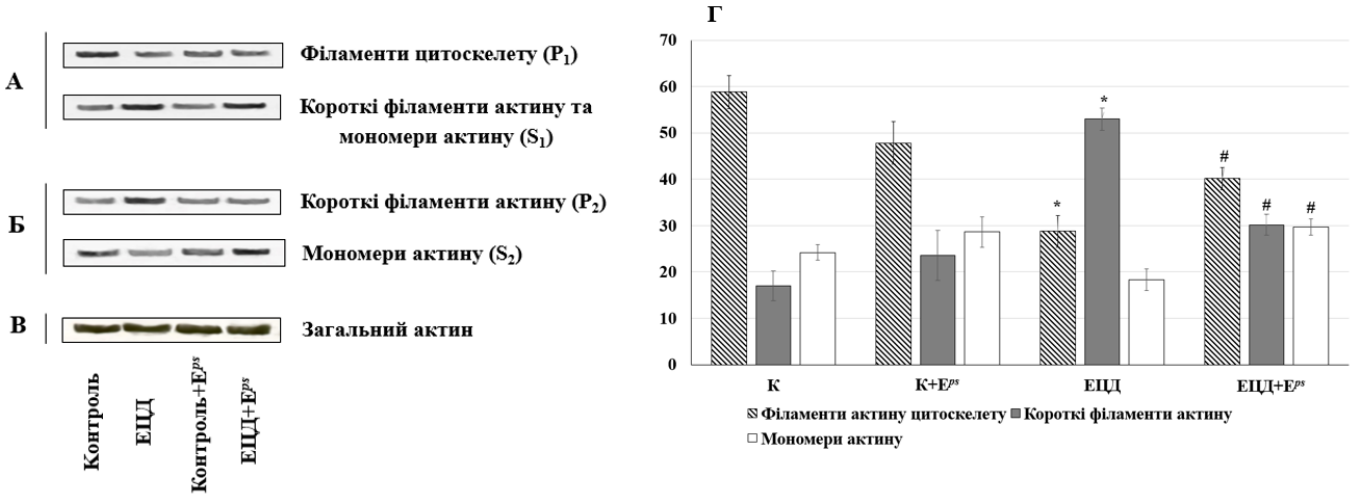

Рис. 8. Дослідження методом імуноблот-аналізу рівня актину у лейкоцитах щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні E^{ps}.

А – Імуноблот-аналіз фракцій, що містили довгі актинові філаменти цитоскелету та суміш коротких філаментів і мономерів актину; **Б** – Імуноблот-аналіз фракцій, що містили короткі філаменти і мономери актину; **В** – Імуноблот-аналіз загального рівня актину, що містить довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі філаменти і мономери актину; **Г** – Вміст актину у фракціях лізатів лейкоцитів, що містили довгі актинові філаменти, короткі філаменти та мономери актину. Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів (рис. 8, А-В). Вміст актину у кожній фракції виражений як відсоток від загального вмісту актину визначений для відповідної групи

Аналіз отриманих результатів щодо перерозподілу актину між філаментами цитоскелету, які є його конститутивною фракцією, короткими філаментами та мономерами показав, що у клітинах контрольної групи тварин ці три форми актину розподілялися, як 58,8 ± 3,5 %, 17,0 ± 3,2 % і 24,2 ± 1,6 %, відповідно. Отже, полімеризований актин домінує щодо мономерів актину у співвідношенні 7,6 : 2,4. В

лейкоцитах тварин з ЕЦД актин розподілявся як: 28,7 ± 3,4 % – фракція філаментів цитоскелету, 52,9 ± 2,4 % – короткі актинові філаменти і 18,2 ± 2,3 % припадало на мономери актину. Тобто, вміст полімеризованого актину щодо мономерів актину співвідноситься як 8,16 : 1,8. 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 – мономерний актин (рис. 8). Після введення E^{ps} тваринам контрольної групи вміст актину в окремих фракціях лізатів лейкоцитів розподілявся як 47,8 ± 4,5 % у фракції, яка містила філаменти цитоскелету, 23,5 ± 5,3 % формували короткі актинові філаменти і 23,8 ± 2,3 % припадало на мономери актину. Введення екстракту тваринам з ЕЦД призводило до перерозподілу цих трьох форм актину у такому відсотковому співвідношенні – 40,16 ± 2,4 %, 30,14 ± 2,2 % і 29,68 ± 1,78 %. Таким чином співвідношення полімеризованого актину до мономерів актину становить 7,1 : 2,3 у лейкоцитах 2-ї групи та 7,0 : 2,9 у 4-й групі. Отже, у разі введення E^{ps} контрольним тваринам рівень F-актину у лейкоцитах не змінювався, натомість знижувався у тварин хворих на цукровий діабет (рис. 8).

Отримані результати дають змогу зробити висновок про те, що при введенні досліджуваного екстракту у лейкоцитах тварин з ЕЦД 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 (рис. 8). Отже, встановлений нами коригуючий ефект E^{ps} на функціональний стан лейкоцитів може реалізуватися завдяки впливу на процеси реорганізації елементів актинового цитоскелету. Можна припустити, що вплив досліджуваного екстракту на формування елементів цитоскелету за умов ЕЦД на фоні тривалої гіперглікемії найімовірніше зумовлена наявністю у його складі сполук, які виявляють гіпоглікемічну дію і таким чином здатні пригнічувати процеси глікозилювання, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету [Collison K., 2002].

Отже, ефективну антидіабетичну дію E^{ps} підтверджено комплексними дослідженнями його прямих і опосередкованих біологічних ефектів на рівень глікемії, структурно-функціональний стан лейкоцитів та клітин острівців Лангерганса підшлункової залози щурів з ЕЦД. Встановлений нами широкий спектр біологічних ефектів досліджуваного екстракту зумовлений наявністю у його складі сполук з підтвердженими гіпоглікемічними, антиоксидантними, протизапальними та антиапоптичними властивостями.

На рис. 9. наведено узагальнюючу схему молекулярних ефектів E^{ps} за ЕЦД, на якій зазначено можливі мішені впливу компонентів цього екстракту.

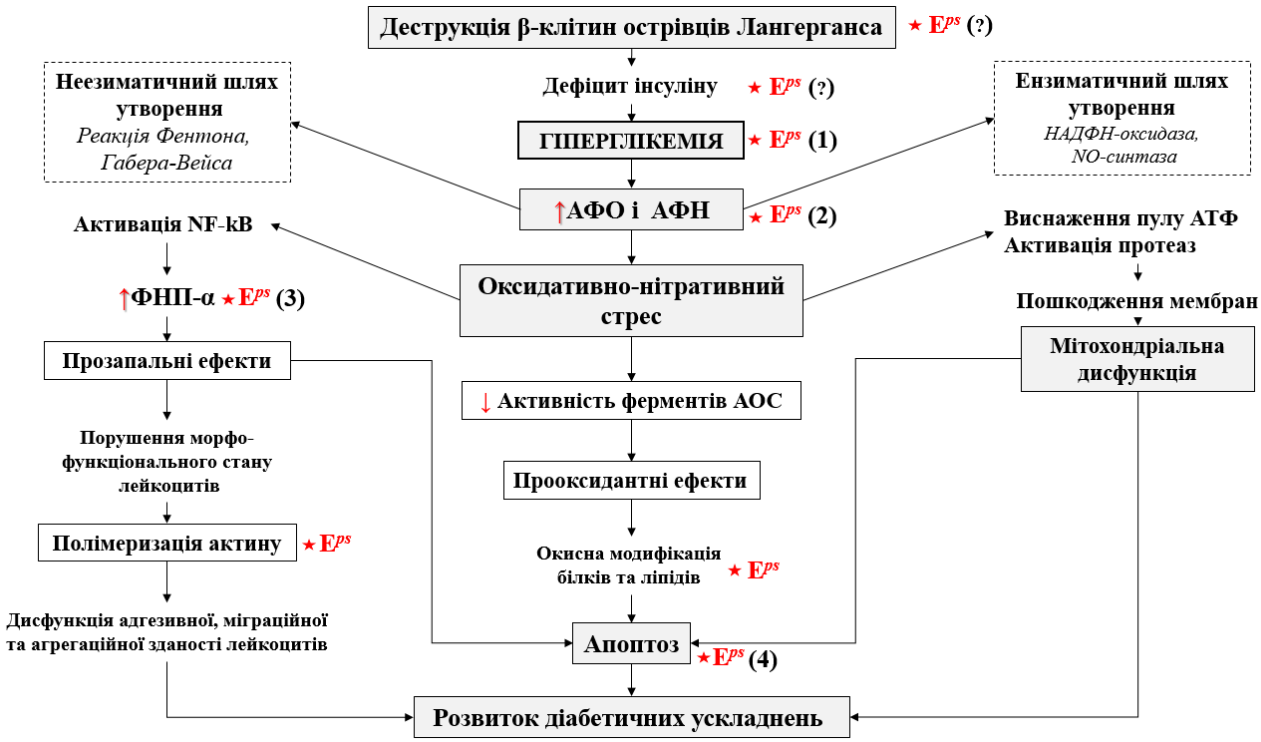

Рис. 9. Узагальнююча схема молекулярних механізмів дії E^{ps} за ЕЦД (червоні позначення вказують на гіпотетичні мішені впливу біологічно активних компонентів досліджуваного екстракту). Діючі компоненти екстракту: (1) – фітол, естер пальмітинової кислоти, α-амірин, похідні хіназоліну; (2) – флавоноїди, вітамін Е, жирні кислоти, фітол, сквален; (3) – метиловий естер ліноленової кислоти, α- амірин; (4) – метиловий естер ліноленової кислоти, лоліолід.

Аналіз виявлених нами ефектів антидіабетичної дії E^{ps} дає підстави стверджувати його гіпоглікемічна дія реалізується за панкреатичним механізмом і є результатом прямого протекторного впливу компонентів екстракту на структурно-функціональний стан острівцевого апарату підшлункової залози. Окрім того, встановлене нами підвищення толерантності до глюкози у разі введення цього екстракту тваринам з ЕЦД, що може бути пов'язано зі повільненням її всмоктування у шлунково-кишковому тракті, і призводити до більш рівномірного навантаження на інсулярний апарат, є підтвердженням позапанкреатичного механізму його дії. Також ефектом прямої дії E^{ps} є його здатність попереджати розвиток оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах щурів за стрептозотоцинового діабету впливаючи на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу інактивуючи вільні радикали та запобігаючи інгібуванню ключових компонентів ензиматичної ланки АОС. Зміна решти досліджуваних показників при діабеті у відповідь на введення E^{ps} є опосередкована його гіпоглікемічною та антиоксидантною дією, та/або може бути може бути зумовлена протизапальними та антиапоптичними властивостями його компонентів. На основі вищенаведених даних можна стверджувати, що фізіологічна дія E^{ps} є поліфункціональною.

Отримані дані про молекулярні ефекти впливу E^{ps} на структурно-функціональний стан острівцевих клітин підшлункової залози та лейкоцитів обгрунтовують доцільність розробки нових фармакологічних препаратів антидіабетичної дії на основі БФЕГЛ. Такі препарати можуть бути перспективними

не лише при лікуванні хворих на цукровий діабет 2-го, а й 1-го типу зважаючи на їхню здатність виявляти цитопротекторний вплив на β-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень здійснено стабілізацію безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) додаванням біогенних поверхнево-активних речовини, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas* sp. PS-17. Ефективну антидіабетичну дію цього екстракту підтверджено комплексними дослідженнями його біологічних ефектів на лейкоцити та β-клітини підшлункової залози здорових щурів та тварин з ЕЦД.

1. Розроблено спосіб стабілізації БФЕГЛ додаванням біоПАР, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17. Отримано E^{ps} збагачений компонентами, що потенційно мають гіпоглікемічну (фітол (3,68 %), етиловий естер пальмітинової кислоти (15,48 %), фітостероли – кампестерол (1,97 %) і стігмастерол (14,73 %), похідні хіназоліну (2,89 %)), антиоксидантну (фітол (3,68 %), флавоноїди (2,98%) вітамін Е (0,46%)) та протизапальну (флавоноїди (2,98 %), метиловий естер ліноленової кислоти (33,03 %), α-амірин (1,93%) дію.
2. Встановлено виражену гіпоглікемічну дію E^{ps} у дозі 0,6 г/кг маси тіла за ЦД, індукованого введенням стрептозотоцину, про що свідчить зниження концентрації глюкози й глікозильованого гемоглобіну у крові, підвищення толерантності клітин до глюкози, зростання концентрації С-пептиду та інсуліну у плазмі щурів.
3. У разі ЕЦД відмічено ураження інкреторного апарату підшлункової залози, які є характерними для цієї патології: зменшується кількість панкреатичних острівців на стандартній одиниці площі, їхня площа, діаметр, об’єм та кількість β-клітин порівняно з контролем. При введенні E^{ps} в дозі 1,2 г/кг маси тіла встановлено виражену цитопротекторну дію на β-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози.
4. Введення E^{ps} попереджає розвиток оксидативно-нітритивного стресу в лейкоцитах щурів за стрептозотоцинового діабету пригнічуючи утворення АФО і виявляє інгібуючу дію на активність NO-синтази знижуючи надпродукцію NO у лейкоцитах, знижує інтенсивність процесів окисної модифікації білків та ліпідів, а також сприяє підвищенню активності ключових ферментів АОС (СОД, каталази і ГПО).
5. Застосування E^{ps} призводить до зменшення кількості лейкоцитів з ознаками апоптозу у щурів з ЕЦД, що підтверджує його пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель цих клітин, інтенсивність якої значно підвищується при досліджуваній патології.
6. Показано зростання рівня включення в проліферуючі клітини 5-бром-2'-дезоксиуридину за умов ЕЦД на фоні збільшення кількості лімфобластів та вмісту ФНП-α, що свідчить про підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів. При введенні діабетичним тваринам E^{ps}

спостерігали зниження вищезазначених показників, які характеризують рівень проліферації клітин білого ростка кісткового мозку.

7. Методами протокової цитометрії із застосуванням фалоїдину міченого ТРІТЦ та імуноблот-аналізу встановлено зростання вмісту F-актину в лейкоцитах за ЕЦД, що вказує їх преактивований стан. На фоні підвищення загального рівня F-актину зменшується кількість актинових філаментів цитоскелету, водночас зростає вміст коротких філаментів актину. Доведено коригуючий ефект E^{ps} на функціональний стан лейкоцитів, який може реалізуватися через вплив на процеси формування елементів актинового цитоскелету.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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, Y. Chajka, N. Sybirna // Curr. Issues Pharm. Med. Sci. – 2013. – Vol. 26. – No. 4. – P. 393–397. *(Дисертант опрацювала дані літератури та власні результати, їй належить участь в експериментальній роботі та написанні статті).*

2. 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 // Укр. біохім. журн. – 2015. – Т. 87, № 4.– С. 78–86. *(Здобувач опрацювала дані літератури та власні результати, брала участь в експериментальній роботі, написанні статті та підготовці матеріалів до друку).*

3. 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. (*Дисертант брала участь у проведенні експериментальних досліджень та статистичної обробки даних, проаналізувала та узагальнила літературні джерела, брала участь в написанні та оформленні статті*).

4. 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 // Мед. хім. журн. – 2014. – Т. 16, № 3.– С. 108–110. *(Здобувачем особисто проведено дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготовлено матеріали до друку).*

5. 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 // Біол. Студ.– 2015. – 9, №1. – С. 5–16. *(Дисертант брала участь у формуванні основної ідеї статті, здійснено отримання стабілізованої безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського, проведено опрацювання літературних даних і власних результатів, участь у їх аналізі та написанні статті).*

6. 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 // Укр. біофарм. жур. – 2013. – №4 (27). – С. 104–107. (*Здобувачу належить опрацювання робочої схеми експерименту, отримання й аналіз експериментальних і літературних даних, а також участь в написанні та оформленні статті).*

7. 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 // Молодь і поступ біології: збірник тез IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (16-19 квітня 2013 року, м. Львів). – Львів, 2013. – С. 67–68. *(Здобувачем особисто проведено дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготовлено матеріали до друку).*

8. 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, Lviv). – Lviv, 2013. – P. 73. *(Дисертанту належить опрацювання робочої схеми експерименту, аналіз літературних даних і власних результатів, участь у написанні та оформленні тез).*

9. 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 і аспірантів «Молодь і поступ біології», 8 – 11 квітня 2014 р.: збірник тез. – Львів, 2014. – С. 31–32. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді).*

10. 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 р. : зібрник тез. – Київ, 2014. – С. 100–101. *(Дисертанту належить опрацювання робочої схеми експерименту, аналіз літературних даних і власних результатів, участь у написанні та оформленні тез).*

11. Лупак М. NO-синтазниий 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 2014 р.: збірник тез. – Львів, 2014. – С. 60–61. *(Здобувачем особисто проведено дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготовлено матеріали до друку).*

12. 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 міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 20-23 квітня 2015 р. : зібрник тез. – Львів, 2015. – С. 70–71. *(Дисертанту належить опрацювання робочої схеми експерименту, аналіз літературних даних і власних результатів, участь у написанні та оформленні тез).*

АНОТАЦІЯ

Лупак М. І. Молекулярні механізми антидіабетичної дії екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка Міністерства освіти і науки України, Львів, 2015.

Дисертація присвячена дослідженню біохімічних ефектів дії безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської (*Galega officinalis* L.) на структурно-функціональний стан лейкоцитів та β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози щурів за цукрового діабету, індукованого введенням стрептозотоцину.

Розроблено спосіб стабілізації БФЕГЛ додаванням біоПАР, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17. Методом газової хроматомасспектрометрії визначено компонентний склад E^{ps}. Доведено виражену цукрознижувальну дію E^{ps} (у дозі 0,6 г/кг) та його цитопротекторний вплив на клітини острівцевого апарату підшлункової залози (у дозі 1,2 г/кг) на моделі стрептозотоцинового діабету. З'ясовано, що E^{ps} нівелює прояви оксидативно-нітративного стресу за ЕЦД завдяки здатності компонентів, які є у його складі інактивувати вільні радикали та запобігати інгібуванню ключових ферментів АОС. Продемонстровано пригнічуючий вплив E^{ps} на процес апоптозу лейкоцитів, інтенсивність якого значно підвищується за умов діабету. Виявлено коригуючий вплив на процес проліферації та диференціації клітин попередників лейкоцитів, процес полімеризації актину цих клітин та вміст ФНП-α за досліджуваної патології.

Ключові слова: цукровий діабет, безалкалоїдний екстракт *Galega officinalis* L., оксидативно-нітративний стрес, апоптоз, полімеризація актину, лейкоцити, β-клітини підшлункової залози.

АННОТАЦИЯ

Лупак М. И. Молекулярные механизмы антидиабетического действия экстракта галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.). - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Львовский национальный университет имени Ивана Франко Министерства образования и науки Украины, Львов, 2015.

Диссертация посвящена исследованию биохимических эффектов действия безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.) на структурно-функциональное состояние лейкоцитов и β-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы крыс в условиях сахарного диабета, индуцированного введением стрептозотоцина.

Разработан способ стабилизации БФЭГЛ добавлением биоПАР, синтезируемых бактериями *Pseudomonas* sp. PS-17. Методом газовой хромато-мас-спектрометрии определено компонентный состав E^{ps}. Доказано выраженное сахароснижающее действие E^{ps} (в дозе 0,6 г/кг) и его цитопротекторное влияние на клетки островкового аппарата поджелудочной железы (в дозе 1,2 г/кг) на модели стрептозотоцинового диабета. Выяснено, что E^{PS} нивелирует проявления оксидативного-нитративного стресса в условиях ЭЦД благодаря способности компонентов, входящих в его состав выступать в качестве скавенджера свободных радикалов и предотвращать ингибирование ключевых ферментов АОС. Применение исследуемого экстракта способствует угнетению апоптоза лейкоцитов, интенсивность которого значительно повышается в условиях диабета. Установлено корригирующее влияние на процессы пролиферации и дифференциации клеток предшественников лейкоцитов, а также полимеризации актина и содержание ФНО-α в плазме крови при исследуемой патологии.

Ключевые слова: сахарный диабет, безалкалоидный экстракт *Galega officinalis* L., оксидативно-нитративний стресс, апоптоз, полимеризация актина, лейкоциты, β-клетки поджелудочной железы.

SUMMARY

Lupak M. Molecular mechanisms of *Galega officinalis* extract antidiabetic action. – Manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of biological sciences, field 03.00.04 biochemistry. – Ivan Franko National University of Lviv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2014.

The main purpose of dissertational work was to research biochemical effects of alkaloid-free *Galega officinalis* L. fraction on structural and functional state of rats' leucocytes and pancreatic cells under conditions of diabetes mellitus induced by streptozotocin.

A method of alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* stabilization by addition of biological surface active agent synthesized by *Pseudomonas* sp. PS-17 bacteria was developed. Using gas chromatographic-mass spectrometric method were found component composition of stabilized alkaloid-free fraction from *Galega officinalis,* which includes 31 compound, 26 of them were identified. Component composition include higher fatty acids and their esters (63.90% of all components), monoterpenes - loliolid (1.43%), diterpenes - Neophytadiene (1, 93%) and phytol (3.675%), triterpenes - squalene (0.343%) and α-amyrine (1,932%), phytosterols - campesterol (1.966%) and stigmasterol (14.725%), flavonoids (2.98%), vitamin E (0,46%).

Pronounced hypoglycemic effects of stabilized alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* (at a dose of 0.6 g/kg) and its cell protective effects on Langerhans islet cells of the pancreas system (at a dose of 1.2 g/kg) over a model of streptozotocin-induced diabetes were proved. A statistically significant increase in the density index of the Langerhans islets, their individual parameters and the number of incretory cells are as evidence of these effects. Relative maintaining β-cells, with features of minor cytoplasm vacuolization and decreased levels of degranulation were detected. Stabilized alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* protective effect on pancreas' β-cells in case of diabetes mellitus is confirmed by the increase of C-peptide and insulin concentrations in the blood plasma of rats that was found in the study. Also it was revealed, that Stabilized alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* prevents the development of oxidative stress under experimental diabetes conditions due to the ability of its components scavenging free radicals and to prevent inhibition of main antioxidant enzymes. Depressive influence of Stabilized alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* on leucocytes apoptosis, the intensity of which increases notably under conditions of diabetes mellitus was shown. A corrective influence on the proliferation and differentiation of leucocytes' precursor cells, on actin polymerization process of these cells and on TNF-α content was also discovered in our studies of pathology.

Key words: diabetes mellitus, alkaloid-free *Galega officinalis* L. extract, oxidative stress, apoptosis, actin polymerization, leucocytes, pancreatic β-cells.