МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

на правах рукопису

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

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
кандидат біологічних наук, доцент
Гачкова Галина Ярославівна

Львів – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 6

ВСТУП 7

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 13

1.1. Біохімічні механізми виникнення оксидативно- нітративного стресу за умов цукрового діабету першого типу 13

1.1.1. Генерація активованих кисневих метаболітів у лейкоцитах 16

1.1.2. Роль активних форм оксигену у прогресуванні дисфункції підшлункової залози 20

1.2. Роль апоптозу у патогенезі цукрового діабету 1–ого типу 21

1.2.1. Апоптоз у регуляції імунних механізмів, що беруть участь у патогенезі цукрового діабету 1–го типу 21

1.2.2. Роль апоптозу у деструкції β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози 22

1.3. Реорганізація актинового цитоскелету у здійсненні локомоторних функцій лейкоцитів 25

1.3.1. Механізми хемотаксису лейкоцитів 26

1.3.2. Реорганізація актинового цитоскелету – головний інструмент і механізм для активного переміщення клітин 28

1.4. Молекулярні механізми антидіабетичної дії субстанцій, наявних у складі лікарських рослинах 33

1.4.1. Механізми цукрознижувальної дії 34

1.4.2. Механізми антиоксидантної дії 40

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 42

2.1. Умови проведення досліджень 42

2.2. Характеристика об’єкту досліджень 43

2.3. Отримання безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської (*Galega* 43

officinalis L.)
2.4. Виділення поверхнево-активного біокомплексу PS та стабілізація безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської 44
2.5. Аналіз якісного і кількісного складу стабілізованої безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської 45
2.6. Хроматомасспектрометричне визначення компонентного складу стабілізованої безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської 46
2.7. Морфологічні дослідження клітинних елементів крові 47
2.7.1. Приготування мазків крові 47
2.7.2. Фарбування клітин за Романовським-Гимзою 47
2.8. Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом 47
2.9. Визначення толерантності клітин до глюкози 48
2.10. Приготування гемолізатів еритроцитів 48
2.11. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну 49
2.12. Імуноферментний аналіз вмісту інсуліну, С-пептиду та фактора некрозу пухлин альфа 49
2.13. Світлова мікроскопія клітин підшлункової залози 49
2.14. Виділення сумарної фракції лейкоцитів з периферичної крові щурів 51
2.15. Визначення кількості лейкоцитів 51
2.16. Флуоресцентно–мікроскопічне дослідження рівня генерації активних форм оксигену у лейкоцитах периферичної крові щурів 52
2.17. Отримання лізатів лейкоцитів 52
2.18. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків 53
2.18.1.ТБК-позитивні продукти 53
2.18.2. Карбонільні групи білків 54
2.19. Визначення активності ензимів антиоксидантного захисту 54
2.19.1. Активність супероксиддисмутази 54
2.19.2. Активність каталази 56

2.19.3. Активність глутатіонпероксидази 57
2.20. Визначення сумарної активності NO-синтази 59
2.21. Визначення вмісту нітрит-аніонів 59
2.22. Визначення вмісту нітрат-аніонів 60
2.23. Визначення концентрації білка за методом Лоурі 60
2.24. Методи дослідження стану актинового цитоскелету 60
2.24.1. Кількісна оцінка вмісту полімеризованого актину методом протокової цитометрії з використанням фалоїдину міченого ТРІТЦ 60
2.24.2. Фракціонування актину у лізатах лейкоцитів 61
2.24.3. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі 62
2.24.4. Імоноблотинг білків.. 63
2.25. Методи дослідження апоптозу лейкоцитів 64
2.25.1. Імуноцитохімічна детекція вмісту білків p53 і Bcl-2 64
2.25.2. Флуоресцентний аналіз апоптозу за зв'язуванням анексину V 65
2.26. Оцінка проліферативної активності клітин кісткового мозку лімфоцитарно - гранулоцитарного ряду 66
2.26.1. Фарбування мазків кісткового мозку (комбіноване забарвлення Май - Грюнвальда-Романовського-Гимзи за Папенгеймом) 67
2.27. Статистична обробка результатів 68
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 69
3.1. Стабілізація безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської за допомогою біогенних поверхнево-активних речовин, що синтезуються штамом бактерій *Pseudomonas* sp. PS-17 69
3.2. Дослідження компонентного складу E^{ps} 74
3.3. Дослідження цукрознижувальної дії E^{ps} за умов експериментального цукрового діабету 77
3.4. Вплив E^{ps} на прояви оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах периферичної крові щурів за експериментального цукрового діабету 85
3.5. Вплив E^{ps} на процес апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів у 91

нормі та за умов ЕЦД
3.6. Вплив E^{ps} на процеси проліферації та диференціації попередників лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД 97
3.7. Дослідження процесу полімеризації актину у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за ЕЦД та на фоні введення стабілізованої безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської.. 100
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 107
ВИСНОВКИ 124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 126

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система;

АФН – активні форми нітрогену;

АФО – активні форми оксигену;

Біо-ПАР – біогенні поверхнево-активні речовини;

БФ ЕГЛ – безалкалоїдна фракція екстракту галеги лікарської;

ЕЦД – експериментальний цукровий діабет;

ІЛ – інтерлейкін;

ІФН – інтерферон;

ОМБ – окисна модифікація білків;

ПАР – поверхнево-активні речовини;

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;

ТБК – тіобарбітурова кислота;

ЦД – цукровий діабет;

ФНП – фактор некрозу пухлин;

AUCglu (*area under a curve*) – площа під глікемічними кривими;

E^{ps} – стабілізована безалкалоїдна фракція галеги лікарської;

HbAIc (англ. glycated haemoglobin (A1c)) – глікозильований гемоглобін;

MafA (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) – активатор транскрипції гена інсуліну;

NF-κB (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β-cells) – ядерний фактор κB;

NO – оксид (II) нітрогену;

PDX-1 (*Pancreatic and duodenal homeobox*) – головний транскрипційний чинник утворення і диференціювання β-клітин;

PI-3’-K – фосфатидилінозитол-3’-кіназа;

PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) – родина рецепторів-активаторів проліферації пероксисом

ВСТУП

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 [19, 116, 183]. 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 [19, 89, 183]. 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 [98, 105, 183]. 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 [11, 20, 122, 133]. Порушення процесів полімеризації актину при активації лейкоцитів призводить до зниження функціональної активності фагоцитів, що проявляється розвитком інфекційно-запальних процесів [183].

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 [224] 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 (ДФФД) і Білоруського республіканського фонду фундаментальних досліджень (БРФФД) (проект "Молекулярні механізми антидіабетиної дії препаратів рослинного походження" Ф 54.4/017 (№ держреєстрації 0113U005313), 2013-2014 рр.).

Мета і завдання досліджень

Метою даної роботи було дослідження біохімічних ефектів дії БФЕГЛ 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 порушення структурно-функціонального стану лейкоцитів та клітин острівцевого апарату 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 (визначення активності ензимів, вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та стабільних метаболітів NO), молекулярно-біологічні (флуоресцентно – мікроскопічне дослідження рівня генерації активних форм оксигену, проведення вестерн-блот аналізу та протокової цитометрії), імуноферментні (визначення вмісту визначення концентрації інсуліну, С – пептиду та ФНО-α, оцінка проліферативної активності), цитологічні (світлова мікроскопія), імуноцитохімічні (детекція вмісту білків p53 і Bcl-2), гістологічні (аналіз зразків тканин підшлункової залози), статистичні (метод варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента, метод дисперсійного аналізу ANOVA з використанням критерію Фішера).

Наукова новизна отриманих 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 E^{ps} на лейкоцити та β-клітини підшлункової залози здорових щурів та тварин з ЕЦД підтверджують його антидіабетичну дію. E^{ps} виявляє виражену цукрознижувальну дію, цитопротекторний вплив на інкреторний апарат підшлункової залози та коригує порушення структурно-функціонального стану лейкоцитів. Отримані дані вказують на доцільність пошуку і розробки на його основі нових фармакологічних препаратів для лікування ЦД не лише 2-го, але й 1-го у зв’язку з можливістю відновлення β-клітин острівців Лангерганса, що є особливо актуальним. Представленні 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 досліджень

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 роботи

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 таблицею.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні механізми виникнення оксидативно-нітративного стресу за умов цукрового діабету першого типу

Цукровий діабет є багатофакторним метаболічним захворюванням із характерною для нього гіперглікемією, яка виникає внаслідок дефіциту інсуліну або через інсулінорезистентність. На фоні гіперглікемії активується низка метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення активних форм оксигену та нітрогену (насамперед супероксид-аніону ($\bullet O_2^-$), який, взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на •OH, пероксид гідрогену (H_2O_2) та пероксинітрит ($ONOO^-$), що призводить розвитку оксидативно-нітративного стресу:

1. Активація поліолового метаболізму глюкози. Зростання внутрішньоклітинного рівня глюкози за умов гіперглікемії посилює конверсію цього моносахариду за участі альдозоредуктази в сорбітом, що супроводжується виснаженням пулу НАДН(H^+) [18]. Це призводить до зниження вмісту відновленого, важливого антиоксиданту – глутатіону та інтенсифікації оксидативно-нітративного стресу [89].

2. Активація гексозамінового шляху утилізації глюкози. У разі підвищення внутрішньоклітинного рівня глюкози надлишок фруктозо-6-фосфату оминає гліколіз, і стає субстратом для ферменту глутамін-фруктозо-6-фосфат амінотрансферази. Цей фермент перетворює фруктозо-6-фосфат у глюкозамін-6-фосфат, який потім перетворюється на уридин дифосфат-N-ацетил глюкозамін. Останній є необхідним для утворення глікозильованих ланцюгів білків і ліпідів. Специфічні O – глюкозамін – N - ацетил трансферази використовують цей метаболіт для посттрансляційної модифікації серинових і треонінових залишків цитоплазматичних і ядерних білків, що в результаті сприяє модифікації їхніх біологічних функцій [22, 62].

3. Активація перетворення сорбітолу у фруктозу. У разі хронічної гіперглікемії підвищується вміст проміжного метаболіту гліколізу – дигідроксіацетонфосфату (ДГАФ). ДГАФ відновлюється до гліцерол-3-фосфату, який, кон'югуючись з жирними кислотами, індукує *de novo* синтез діацилгліцеролу (ДАГ) [60], що активує протеїнкіназу С (ПК С) [125]. За участю ПК С відбувається індукція НАДФН-оксидази. Основна функція цього ферменту полягає у генерації $O_2^{\cdot -}$ в основному для клітинної бактерицидної функції [45].

4. У результаті неферментативного глікозилювання утворюються кінцеві продукти (AGEs), які безпосередньо або через рецептор AGEs (RAGEs) призводить до продукції АФО [71, 79]. Кінцеві продукти глікозилювання також є важливими активаторами ферменту НАДФН-оксидази [104].

5. Дихальний ланцюг мітохондрій також є джерелом утворення АФО. За умов фізіологічної норми практично увесь кисень використовується у мітохондріях для синтезу АТФ і лише 1–2 % використовується на синтез АФО. За ЦД це співвідношення зміщується у бік утворення $\bullet O_2^-$ [183].

Відомо, що за фізіологічних умов у метаболізмі глюкози у ЦТК функціонують переносники електронів, ключовим із яких є НАДН, він передає свій електрон на комплекс I електрон-транспортного ланцюга мітохондрій (рис. 1.1). Інший електронний донор, який генерується в ЦТК – $ФАДН_2$, передає свій електрон до комплексу II. Електрони з обох комплексів передаються на коензим Q, а потім переносяться до комплексу III, цитохрому с, комплексу IV і врешті-решт до молекули кисню, яку вони відновлюють до води. Енергія, яка вивільняєть ся під час передачі електрона частково використовується комплексами I, III, і IV на перекачування протонів через внутрішню мебрану мітохондрій – з матриксу в міжмембранний простір. У результаті цього генерується електрохімічний потенціал протонів (комбінації градієнта протонів і електричної напруги) на внутрішній мембрані мітохондрій. Енергія цього потенціалу використовується на синтез АТФ за допомогою АТФ-синтази [183].

.

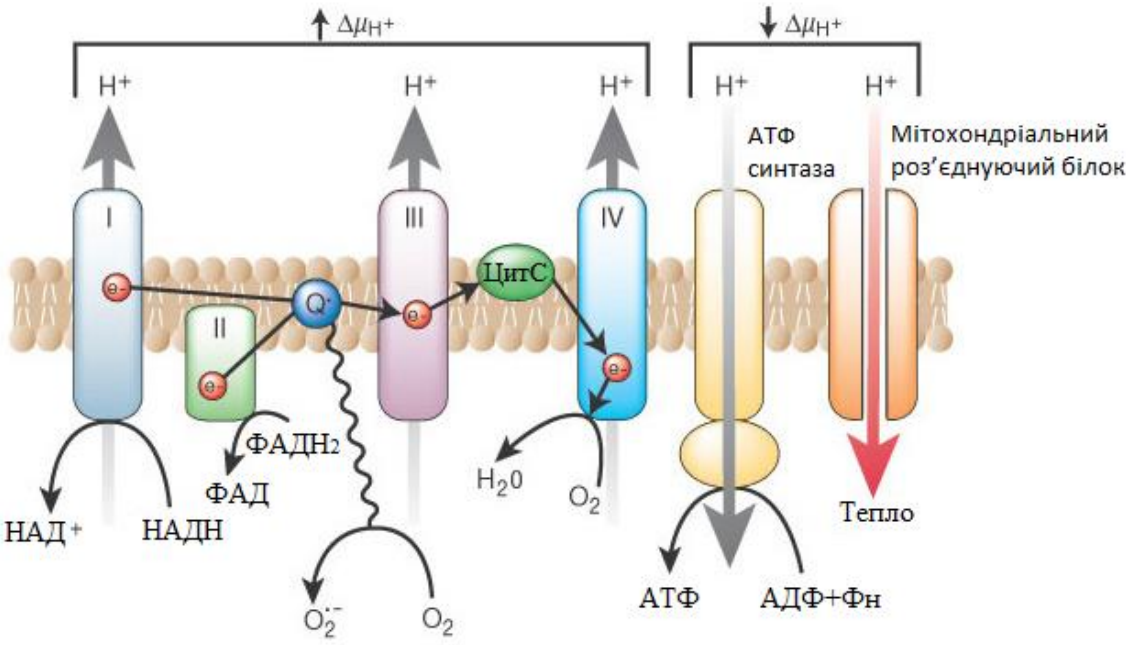

Рис. 1.1. Індукований гіперглікемією процес утворення супероксид-аніона ($\bullet O_2^-$) у електрон -транспортному ланцюзі мітохондрій.

У клітинах позбавлених механізму запобігання транспортуванню надлишку глюкози з кровотоку в цитоплазму та/або її реекспорту (зокрема, ендотеліальних), за умов гіперглікемії починається її накопичення. Це, у свою чергу призводить до інтенсифікації гліколізу, ЦТК, що врешті зумовлює інтенсифікацію роботи електронтранспортного ланцюга мітохондрій. Мембранний потенціал зростає до критичної межі, що призводить до блокування III комплексу мітохондрій, і електрон із коензима Q передається на молекулу кисню з утворенням $\bullet O_2^-$ (рис. 1.1) [18]. За умов гіперглікемії мітохондріальна супероксиддисмутаза неспроможна диспропорціонувати надмірну кількість $\bullet O_2^-$ [182]. За наявності у клітині NO та $\bullet O_2^-$, зазвичай, відбувається утворення пероксинітриту ($ONOO^-$) [182] – надзвичайно цитотоксичної сполуки [19, 116]. Зростання вмісту $ONOO^-$ призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу, який супроводжується перекисним окисненням ліпідів, посттрансляційною модифікацією білків по залишках тирозину (утворюються 3-нітропохідні), розривами ДНК, змінами у клітинному сигналюванні

та ін. [116, 182]. У відповідь на ушкодження ДНК активується репараційний комплекс, до складу якого входить ензим полі-АДФ-рибозополімераза-1 (ПАРП-1). Використовуючи НАДН як субстрат, даний ензим полі-(АДФ)-рибозилює низку білків, в тому числі гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (ГАФДГ). Внаслідок пригнічення активності даного ензиму відбувається активація сорбітолового і гексозамінного метаболічних шляхів, а також накопичення метилгліоксалю та активація протеїнкінази С (ПКС). Дані процеси можуть значно посилювати патологічні зміни, що відбуваються за умов прогресування ЦД [19, 116]. Водночас, в активному стані ПАРП-1 здатна індукувати експресію низки прозапальних цитокінів, а також індуцибельної NO-синтази, що в свою чергу, може посилювати оксидативно-нітративний стрес [182].

Іншою важливою складовою розвитку оксидативно-нітративного стресу є зниження ефективності АОС. За умов гіперглікемії відбувається глікозилювання та інактивація антиоксидантів [74].

Таким чином, порушення в електронтранспортному ланцюзі мітохондрій при гіперглікемії є основним механізмом виникнення оксидативно-нітративного стресу. Зростання вмісту супероксид-аніону за умов гіперглікемії, а також здатність його при взаємодії з NO утворювати цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних і метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету.

1.1.1. Генерація активованих кисневих метаболітів у лейкоцитах

Нейтрофіли є лейкоцитами, які беруть участь у процесі фагоцитозу крім того, що використовують кисень для дихання, у відповідь на певні стимули генерують активовані кисневі метаболіти. Основна кількість кисню використовується для забезпечення метаболічних і енергетичних потреб. Приблизно 15% оксигену нейтрофіли витрачають на генерацію АФО в процесі нормальної життєдіяльності клітин [161].

Згідно з даними літератури лейкоцити мають три ферментативні системи генерації АФО й АФН: мембранозв'язану НАДФН-оксидазу, пероксидази – мієлопероксидазу у нейтрофілах та еозинофільну пероксидазу в еозинофілах, а також NO-синтазу [186, 195].

Головним джерелом АФО є реакція одноелектронного відновлення молекулярного кисню, під час якої утворюється супероксид-аніон. У нейтрофілах він утворюється переважно за участю НАДФН-оксидазного комплексу цитоплазматичної мембрани, мембран фагосом, ферментів дихального ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій і ендоплазматичної системи цитохрому Р-450.

Супероксид-аніон взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на $^{\cdot}OH$, пероксид водню та пероксинітрит ($ONOO^{-}$). Гідроксильний радикал ($OH^{\cdot}$), який є основним оксирадикалом, що пошкоджує ДНК, утворюється у реакції Фентона з H_2O_2 за участю іонів Fe^{2+} (Cu^{+}). Іншим продуктом цієї реакції є гідроксильний аніон (OH^{-}). Якщо з пероксидом водню взаємодіє $O_2^{\cdot-}$ у присутності іонів Fe^{2+} (Cu^{+}), тоді утворюються O_2, OH^{-} та $^{\cdot}OH$ (реакція Хабер-Вайса).

Найбільше піддаються деструктивному впливу NO β-клітини острівців Лангерганса, деструкція і дисфункція яких вільними радикалами є ключовою ланкою розвитку ЦД 1 типу. Джерелом утворення NO у цьому випадку є макрофаги і власне β-клітини. При цьому посилення цитотоксичного ефекту спостерігається при індукції синтезу NO і експресії індуцибельної NO-синтази цими клітинами за дії цитокінів (особливо лімфоцитарного цитокіну ІЛ-1β). Безпосередньою мішенню NO є ДНК острівцевих клітин. Не виключено, що NO впливає на регуляцію процесів вивільнення інсуліну глюкозою, інгібуючи активність фосфофруктокінази і тим самим забезпечуючи відкриття АТФ-чутливих калієвих каналів. Крім того, NO сприяє пролонгації запальної реакції в острівцях Лангерганса, інгібуючи індуцибельну циклооксигеназу, і таким чином посилюючи генерацію простагландину E_2. У той же час показано, що у низьких концентраціях NO може стимулювати секрецію інсуліну β-клітинами.

Активація NO може слугувати причиною загибелі макрофагів, кістковомозкових попередників, клітин підшлункової залози тощо. Вважають, що однією з основних мішеней NO при розвитку апоптозу мітохондрії, а саме їх мембранний потенціал, рушійна сила синтезу АТФ. Натомість, інактивація NO-синтази В-лімфоцитів людини, навпаки посилює апоптоз. Слід зазначити, що синтез NO значно інтенсивніше мононуклеарними фагоцитами гризунів, аніж інших видів тварин, і, зокрема, людини.

Крім того, NO інгібує активацію нейтрофілів, активність НАДФН-оксидази, ефективно взаємодіє з O_2^-, в результаті чого знижується продукція H_2O_2, •OH, гіпогалоїдів. Тому синтез NO часто розглядають як захисний механізм, спрямований проти цитотоксичної дії фагоцитів. NO, який утворюється при стимуляції фагоцитів чинить інгібуючи дію інгібує проліферацію клітин кісткового мозку. Припускають, що механізм антипроліферативної дії полягає в інактивації залізовмісних ферментів, які відповідають за синтез АТФ і реплікацію ДНК, або прямим пошкодженням ДНК пероксинітритом.

На даний час вважають, що оксидативно-нітративний стрес відіграє значну роль не тільки в патогенезі цукрового діабету обох типів, а й є причиною супутніх судинних захворювань. Високий рівень глюкози у крові є суттєвим чинником виникнення запальних процесів, на що в першу чергу реагують клітини крові, зокрема лейкоцити [139]. Їх прилипання до стінок артерій відіграє важливу роль не тільки у розвитку процесу запалення, а також є початком розвитку атеросклерозу [130]. Оксидативно-нітративний стрес спричинює активацію імунокомпетентних клітин крові та їхню агрегацію і адгезію. При цьому в активованих лейкоцитах відбувається підвищення синтезу арахідонової кислоти та її метаболітів, цитокінів, кисневих радикалів, секреція лізосомальних ферментів [189]. У забезпеченні окисно-відновної рівноваги крові важливу роль відіграють ПМЯЛ, активований стан яких супроводжується розвитком респіраторного вибуху і генерацією АФО [197], запуск яких відбувається при зв'язуванні стимулюючого фактора з поверхнею клітини (через певні рецептори або при безпосередній взаємодії з мембраною

клітини) з подальшою активацією мембранозв'язаних оксидаз [37]. Активація мембранних оксидаз призводить до збільшення споживання кисню і окиснення глюкози через гексозомонофосфатний шунт з утворенням НАДФН [227]. При цьому відбувається утилізація глюкози як із зовнішнього середовища, так і використання ендогенних запасів клітини [150]. Далі відбувається активація мембранного комплексу – НАДФН-оксидази за участю фосфоліпази С і системи кіназ, зокрема протеїнкінази С [197].

Незважаючи на те, що АФО відіграють важливу біологічну роль у підвищенні стійкості організму до патогенів, низка патологічних станів обумовлена порушенням регуляції продукції АФО: як у бік їхньої надмірної генерації і розвитку оксидативно-нітративного стресу, так і при їх дефіциті. АФО регулюють внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, клітинний цикл та розвиток апоптозу [147]. Високі концентрації АФО (зокрема, H_2O_2) володіють здатністю пригнічувати синтез ДНК і поділ клітин, а також можуть активувати апоптоз [68]. Також АФО впливають на накопичення іонів Ca^{2+} в цитозолі і стимуляцію фосфорилювання білків в результаті активації протеїнкінази С і тирозинкіназ [184]. Показано, що АФО і ліпідні радикали в низьких концентраціях індукують експресію генів (у тому числі протоонкогенів) і поділ клітин. Також АФО активують білки Ras, які відіграють важливу роль у передачі сигналів в ядро клітини [72].

Показано, що накопичення АФО призводить до активації транскрипційного фактора NF-κB, що індукує синтез низки цитокінів і рецепторів, що беруть участь в розвитку імунної та запальної відповіді [105]. Продукція АФО в нейтрофілах, як внутрішньоклітинних, так і позаклітинних, знаходиться під впорядкованим контролем ініціюючих та інгібуючих компонентів різних рецепторно-опосередкованих сигнальних шляхів.

1.1.2. Роль активних форм оксигену у прогресуванні дисфункції підшлункової залози

Гіперглікемія як основний патогенетичний механізм розвитку ЦД може призводити до активації утворення АФО у багатьох клітинах, у тому числі і в острівцевих клітинах підшлункової залози та зумовлювати їх апоптичну загибель. Тобто, пошкодження клітин та їх загибель значною мірою залежить від надмірного утворення АФО, що призводить до розвитку оксидативного стресу в клітинах [31, 110].

β-Клітини підшлункової залози є особливо чутливими до оксидативно-нітративного стресу оскільки вони містять вкрай низький рівень антиоксидантів [154] В острівцях підшлункової залози виявлено зниження експресії низки генів антиоксидантів і практично повну відсутність активності глутатіонпероксидази [155].

За хронічної гіперглікемії відбувається зниження синтезу та секреції інсуліну в результаті пошкоджуючої дії АФО на головні фактори транскрипції у підшлунковій залозі – транскрипційний фактор утворення і диференціювання β-клітин (PDX-1, *Pancreatic and duodenal homeobox 1*) та активатор транскрипції гена інсуліну (MafA, *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) [75, 113, 128].

Надпродукція NO може призводити до апоптозу β-клітин підшлункової залози [83, 152]. Специфічна дія NO на β-клітини полягає в активації гуанілатциклази, що призводить до підвищення рівня цГМФ, інгібування мітохондріальної аконітази та порушень аеробного окиснення глюкози, а отже, пригнічення глюкозостимульованої секреції і синтезу інсуліну. Зниження активності аконітази, яка залучена в цикл Кребса, призводить до повного виснаження внутріклітинних запасів НАДН і АТФ, що і є безпосередньо причиною некрозу β-клітин [17, 192]

Наведені дані дають змогу зробити висновок, що оксидативно-нітративний стрес зумовлений хронічною гіперглікемією призводить до деструкції β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози. Зниження експресії і зв'язування з ДНК регуляторів експресії гена інсуліну – MafA і PDX-1 може слугувати основним механізмом виникнення глюкозотоксичності.

1.2. Роль апоптозу у патогенезі цукрового діабету 1-го типу

1.2.1. Апоптоз у регуляції імунних механізмів, що беруть участь у патогенезі цукрового діабету 1–го типу

Апоптоз відіграє важливу роль у визначенні кількісного і якісного складу клітин імунної системи. Однією з фундаментальних особливостей імунної системи є її здатність не реагувати на молекули власного організму. Для цього у тимусі одночасно з процесами проліферації та дозрівання тимоцитів відбуваються процеси їхньої селекції. Позитивна селекція забезпечує диференціацію тільки тих клітин, Т-клітинні рецептори яких володіють невисокою аффінністю до власних молекул головного комплексу гістосумісності. Т-клітини, які володіють дуже високою або дуже низькою аффіністю до власних молекул головного комплексу гістосумісності, піддаються апоптозу і гинуть. Деякі Т-клітини, що пройшли позитивну селекцію, можуть мати рецептори, що розпізнають не молекули головного комплексу гістосумісності, а інші компоненти власних тканин. Такі клітини піддаються негативній селекції. Частина аутореактивних Т-лімфоцитів уникає контролю, що пояснюють відсутністю в тимусі деяких аутологічних антигенів, і поступає на периферію. Також до появи аутореактивних Т-лімфоцитів на периферії призводить порушення в цих клітинах апоптозу. На периферії зрілі Т-клітини можуть піддаватися додатковому процесу селекції, в ході якої Т-лімфоцити, взаємодіючи з аутоантигенами, експресованими на периферії, елімінуються [204]. Fas-система бере участь у клональній делеції аутореактивних Т-клітин в периферичних лімфатичних органах і в елімінації активованих Т-клітин [109]. Отже, система Fas-FasL займає

центральне місце в регуляції периферичної іммунної відповіді. В імунній системі Fas і FasL залучені в регуляцію іммунних реакцій і забезпечують опосередковану Т-лімфоцитами цитотоксичність. В основному FasL експресується активованими $CD4^+$ і $CD8^+$ Т-клітинами [109]. Fas в основному експресується зрілими Т-лімфоцитами, але експресія його збільшується після активації антигеном, що робить Т-клітини більш чутливими до апоптозу. Якщо в системі Fas-FasL є дефект, активовані лімфоцити можуть акумулюватися [34, 35, 46]. Таким чином, якщо ці клітини не знищені, ймовірність розвитку аутоімунного захворювання підвищується, що було показано в експериментальних моделях на гризунах: мутації *lpr* (limphproliferation) і *gld* (generalired limphproliferative disease) у мишей призводили до втрати функції Fas і FasL відповідно, що стало причиною накопичення активованих лімфоцитів і призвело до виникнення аутоімунних захворювань.

Порушення регуляції апоптозу в лімфоїдних клітинах може стати одним з чинників, залучених в патогенез аутоімунних захворювань [35, 204]. Встановлено, що механізми, які контролюють запрограмовану загибель лімфоцитів, впливають на розвиток аутоіммунітету у NOD (*non-obese diabetic mice*) [204]. Резистентність Т-клітин до апоптозу у NOD мишей зумовлено зростанням вмісту антиапоптотичного білка Bcl-x у Т-клітинах [88, 204], що, і пояснює аутоімунну відповідь при даному захворюванні. Також спостерігається знижена експресія проапоптичного антигену Fas на поверхні Т-лімфоцитів [65].

Таким чином, стійкість лімфоцитів до апоптозу може призводити до пролонгації імунної відповіді і затримки клональної делеції аутореактивних клітин.

1.2.2. Роль апоптозу в деструкції β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози

Виходячи зі сучасних уявлень про патогенез ЦД 1-го типу, загибель β-клітин може відбуватися у результаті різних патологічних процесів – некрозу та / або апоптозу [204]. На сьогоднішній день вважається загальновизнаним, що головною причиною втрати маси панкреатичних β-клітин при ЦД є посилений апоптоз [23, 34,

102, 203], який може виникати внаслідок впливу низки різноманітних чинників. Незважаючи на стрімкий розвиток в даній галузі науки, багато питань залишаються до кінця не з'ясованими і дискусійними [34, 207]. Виділяють такі механізми запуску програми смерті панкреатичних β-клітин, як:

1) взаємодія Fas-рецептора (Fas), експресованого на поверхні β-клітин, з Fas-лігандом (Fas-L) на активованому $CD8^+$ Т-лімфоциті (Т-кіллері) [207];

2) викид перфорину і гранзиму активованими $CD8^+$ Т-лімфоцитами [207]. Перфорин викликає лізис клітин-мішеней, тоді як гранзими А і В сприяють запуску процесу апоптозу;

3) взаємодія цитокінів (ІЛ-1β, ФНП-α, ІФН-γ), які синтезуються різними клітинами, зі специфічними рецепторами на поверхні β-клітин [207]. Патологічна імунна відповідь опосредокована Тх 1 типу, тоді як протективна дія є опосередкованою Тх 2 типу. Підтипи Тх продукують різні цитокіни. Тх-1 виділяють ІЛ-2, ІФН-γ та ФНП-β і опосередковують клітинний імунітет, а Тх-2 виділяють ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-9, ІЛ-10, ІЛ-13 і беруть участь в гуморальному імунітеті. Багато досліджень підтверджують гіпотезу, що цитокіни Тх-1 призводять до деструкції β-клітин, тоді як цитокіни, що секретуються Тх-2, захищають β-клітини шляхом супресії Тх-1 [100, 121, 204]. Зокрема ІЛ-4 і тромбоцитарний фактор росту (ТФР-β) запобігають прогресуванню аутоімунного діабету в панкреатичних β-клітинах мишей лінії NOD.

4) вплив АФО та АФН, що виділяються макрофагами, дендритними клітинами і власне β-клітинами [207];

5) стрес ендоплазматичного ретикулуму [207];

6) мітохондріальний шлях активації каспаз.

Необхідно зазначити, що при ЦД в β-клітині можуть одночасно або послідовно активуватися відразу кілька проапоптотичних шляхів (рис. 1.2).

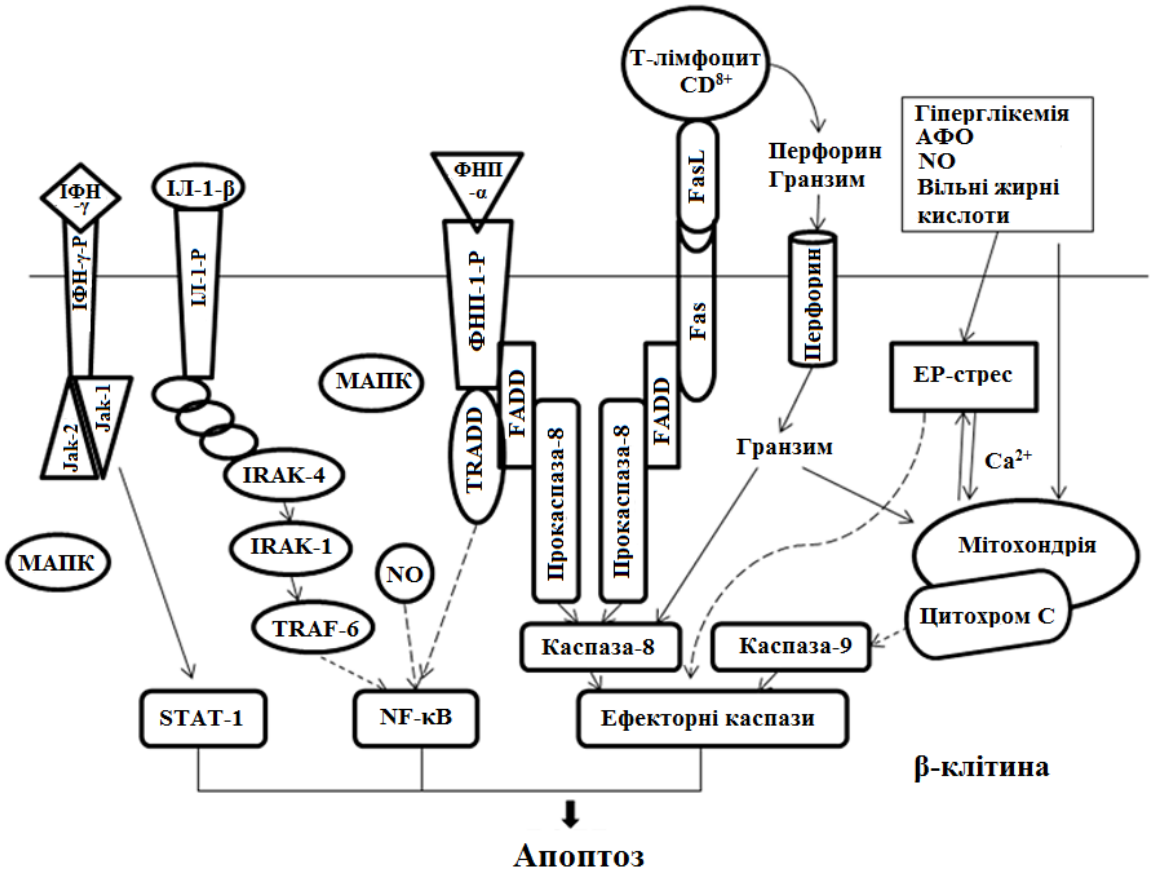

Рис. 1.3. Можливі механізми активації апоптозу β-клітин підшлункової залози за ЦД

МАПК (*mitogen-activated protein kinases*); ІФН-γ-Р, ІЛ-1-Р, ФНП-1-Р – рецептори до ІФН-γ, ІЛ-1-β та ФНП-α; Fas – рецептор родини ФНП-1-Р (рецептор «смерті»); Fas-L – ліганд для мембранного рецептора Fas ; TRADD (*TNFR1-associated DD-protein*) – білок, що взаємодіє з доменом смерті ФНП-1-Р; FADD (*Fas-associated DD-protein*) – білок, що взаємодіє з доменом смерті Fas-рецептора; Jak-1, Jak-2 (*Janus Kinases*); STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*); IRAK1, IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1,4*); TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*)

Оскільки глюкоза є ключовим регулятором інсулінової секреції, логічним було б припустити її активну роль у забезпеченні довгострокової адаптації інсулінової продукції через зміни інтенсивності функціонування і тривалості життя панкреатичних β-клітин. У зв’язку з цим необхідно наголосити на

експериментальних даних які доводять, що за концентрації глюкози від 5,6 ммоль/л до 11,2 ммоль/л і відбувається індукція апоптозу в людських β-клітинах *in vitro*, у той час, як в щурячих острівцях такий рівень глюкози викликав пригнічення апоптозу. Ці дані свідчать про видову специфічність регуляції глюкозою виживання панкреатичних β-клітин [207]. Однак специфічність подібного глюкотоксичного ефекту спостерігається саме у β-клітинах, які надзвичайно чутливі до мінімальних змін концентрації глюкози. Відомо, що короткотривале коливання рівня глюкози в фізіологічних рамках стимулюють секрецію інсуліну, тоді як більш тривале і інтенсивне підвищення глікемії генерує проапоптотичні сигнали [207]. І одним з таких сигналів є ЕПР-стрес, обумовлений довготривалим посиленням процесів біосинтезу інсуліну (накопичення проінсуліну) і хронічним збільшенням концентрації цитозольного Ca^{2+} (на відміну від короткочасного його підвищення у нормі, яке пов’язане з індукованим глюкозою закриттям АТФ-залежних калієвих каналів) [207]. Причому стимуляцію синтезу інсуліну індукує як безпосередньо гіперглікемія, так і опосередкована підвищеною концентрацією глюкози надпродукція АФО, в першу чергу гідроксильного радикала, здатного взаємодіяти з транскрипційним фактором PDX-1, що регулює експресію гена інсуліну [207].

Отже, гіперглікемія і індукований високою концентрацією глюкози оксидативно-нітративний стрес є тією патогенетичною ланкою, на яку в першу чергу повинен бути спрямований терапевтичний вплив.

1.3. Реорганізація актинового цитоскелету у здійсненні локомоторних функцій лейкоцитів

Патогенез дисфункцій клітин крові у разі ЦД 1 типу є надзвичайно складним і недостатньо вивченим. Мікро- і макроангіопатії, які розвиваються за умов діабету, поряд із прискореним прогресуванням атеросклерозу, супроводжуються порушенням кровообігу, підвищеним тромботичним ризиком і є причинами раптової смерті людей, хворих на діабет. Найважливішими функціональними

змінами, які викликають ангіопатії, є підвищення проникності судинної стінки, гемодинамічні розлади, зміни в'язкості крові і дисфункції адгезивної, агрегаційної і міграційної здатності лейкоцитів [63].

1.3.1. Механізми хемотаксису лейкоцитів

У разі ЦД як 1-го так і 2-го типів відзначаються значні порушення в міграції клітин імунного захисту, що значною мірою сприяє розвитку діабетичних ускладнень. На сьогоднішній день в літературі трапляються повідомлення як про зниження здатності клітин до міграції [61], так і до значного посилення хемотаксису [36, 119, 141].

Основний принцип хемотаксису полягає в тому, що зовнішній градієнт хемоаттрактанту трасформується у внутрішній градієнт низкою сигнальних молекул. Останні керують перебудовами цитоскелету і зумовлюють його поляризацію в напрямку руху. Іншими словами, клітина розпізнає зовнішній градієнт, копіює його і спрямовує свою рухову машину в його бік.

Виділяють наступні принципи хемотаксичної сигналізації:

1) поверхневі рецептори реєструють різноманітні зовнішні стимули, але посилення сигналу відбувається на пострецепторному рівні;

2) в клітині є кілька сигнальних каскадів, які передають сигнал від рецептора до цитоскелету;

3) поляризація цитоскелету є кінцевою метою хемотаксчної сигналізації;

4) спеціальні механізми адаптації дозволяють клітині реагувати на просторові і тимчасові змінами зовнішнього градієнту. Вони налаштовують інтенсивність і тривалість активності сигнальних каскадів, і забезпечують їх компартменталізацію.

Природа хемоаттрактантів та їх рецепторів різноманітна. Для імунних клітини крові, таких як нейтрофіли, хемоаттрактантами є чужорідні патогени і цитокіни. Вони вказують на наявність і локалізації в організмі ділянки інфекції або запалення.

Ці клітини дуже чутливі і рухливі. Для хемотаксису вони використовують цитокіни і сполучені з G-білками рецептори.

Для лейкоцитів є характерною конститутивна експресія на клітинній мембрані L-селектинів, рецепторів для P- і E-селектинів, а також низка неактивних інтегринів. Однак, розвиток запального процесу супроводжується вивільненням прозапальних чинників, зокрема ІЛ-1β та ФНП-α, внаслідок чого відбувається активація судинних ендотеліальних клітин, що характризуються експресією низки молекул, таких як P- і E-селектини, рецептори до L-селектинів та інтегринів, що забезпечує їх взаємодію з молекулами адгезії лейкоцитів. Це є початковим етапом процесу міграції лейкоцитів з кров'яного русла. Рух лейкоцитів відбувається у декілька етапів: кочення лейкоцитів по поверхні ендотелію, активація лейкоцитів та інтегринів за участі ГТФ-зв'язуючих Rho-білків, зупинка й адгезія лейкоцитів на поверхні ендотелію та діапедез лейкоцитів [220].

Подальша міграція є опосередкованою процесами адгезивних взаємодій з міжклітинним матриксом та дією хемотаксичних агентів, які утворюються у вогнищі запалення. Найбільш важливими атрактантами для міграції лейкоцитів є хемокіни [178]. Хемотаксис може відбуватись за допомогою як ендогенних (побічні продукти активації комплементу (C3a, C5a), лейкотрієни, лімфкіни і монокіни, фактор еміграції нейтрофілів, імуноглобуліни), так і екзогенних (бактеріальні ліпополісахариди (ендотоксини), продукти руйнування бактеріальних стінок мікроорганізмів (мурамілдипептид), а також продукти розпаду бактерійних білків, що містять у своєму складі N-формілметіонін) чинників [185]. Хемокінам притаманна селективність дії: виокремлюють 4 родини хемокінів, в залежності від розташування двох консервативних цистеїнових залишків в N-кінцевому домені молекули хемокіну: α-хемокіни (впливають на нейтрофільні гранулоцити), β-хемокіни (хемоатраканти для моноцитів), γ-хемокіни (хемоатраканти для Т-лімфоцитів) та δ-хемокіни (хемоатраканти для моноцитів та Т-лімфоцитів) [11, 178].

Відомо, що попередня обробка нейтрофілів ІЛ-8 посилювала хемотаксис, індукований форміл-L-метіонін-лейцин-L-фенілаланіном [178]. Більшість

хемоатракантів, котрі впливають на нейтрофіли зв'язуються з серпентиновими рецепторами, які в свою чергу активують трьохсубодиничні G-білки. Після цього в передачу сигналу залучаються фосфоліпази Cβ, фосфатидилінозитол-3'-кінази (ФІ-3'-кіназа), а також білки, що містять PH-домен (*pleckstrin homology domain*), які здатні зв'язуватись з фосфорильованими ліпідами, продуктами ФІ-3'-кінази і βγ гетеродимерами G-білків.

Механізм розпізнавання хемокінів опосередкований молекулярною рецепцією лігандів плазматичних рецепторів на поверхні лейкоцитів. Мембранні рецептори належать до великого класу G-білок-спряжених рецепторів. За допомогою хемокінів відбувається спрямована міграція до острівців підшлункової залози антигензалежних активованих лейкоцитів (моноцитів, Тх1 $CD4^{+}$-клітин, $CD8^{+}$-клітин і, можливо, НК-клітин), котрі в подальшому секретують низку прозапальних цитокінів, а також цитотоксичні ферменти, що викликають апоптоз і некроз β-клітин [185].

Вивчення міграційної здатності білих клітин крові сприяє розширенню знань про властивості лейкоцитів і відображає їх функціональні можливості при патологічних процесах, що протікають в організмі.

1.3.2. Реорганізація актинового цитоскелету – головний інструмент і механізм для активного переміщення клітин

Будь-які зміни форми і положення клітини в просторі вимагають перебудов клітинного каркасу. Актиновий цитоскелет слугує основним джерелом руху клітини і виконує, таким чином, опорно-рухову функцію. Його зміни відбуваються за трьома основними типами. Кожен із них є найбільш характерний для однієї зі стадій рухового циклу і одного з компартментів клітини. Оборотна полімеризація актину визначає протрузійну (псевдоподіальну) активність переднього краю рухомої клітини, інтегрин-залежна адгезія відповідає за закріплення псевдоподий і тіла

клітини в оточуючому матриксі, а міозин-залежна скоротливість забезпечує підтягування тіла і заднього краю, а також зміну форми клітини.

Псевдоподії складаються з розпластаної ламели, яка на кінці переходить в зовсім плоску ламелоподію. Ламелоподія заповнена мережею актинових філаментів. Вони галузяться в напрямку до переднього краю, а в ламелі латерально взаємодіють як один з одним так і з міозином, утворюючи щільні пучки (рис. 1.3). Мембрана ламелоподії дуже рухлива і безперервно здійснює хвилеподібні рухи, утворюючи складки і дрібні ниткоподібні вирости – гнучкі філоподії і жорсткіші мікрошипи, які наповнені щільними пучками поздовжніх філаментів актину.

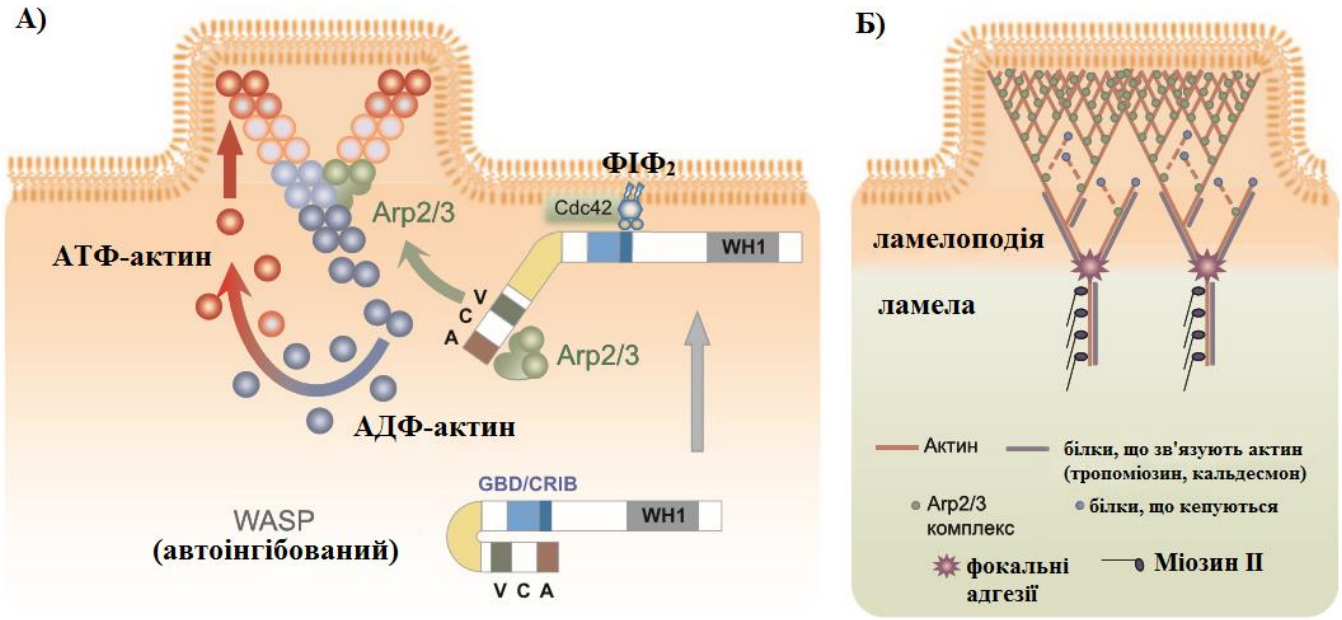

Рис. 1. 3. Структура (А) і полімеризація (Б) актину на передньому краї клітинних протрузій. (А) Тредміллінг і схема активації актину за дії WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome family protein*), Arp2/3 (*Actin-Related Proteins, Arp2/3 complex*), Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) і $ФІФ_2$ (фосфатидилінозитолбіфосфат); (Б) Дендритна структура актину в ламелоподіях і міозин-вмісних пучках у ламелі [177].

Висування псевдоподій забезпечується дендритною полімеризацією актину в ламелоподії. Цей механізм є основою для багатьох форм рухливості і утворення мембранних структур. Ламелоподії заповнені розгалуженою мережею актинових

філаментів. Їх кінці відрізняються за швидкістю приєднання і дисоціації мономерів актину, тобто філаменти за природою полярні. Вони звернені “тупим” (плюс)-кінцем в бік переднього краю мембрани, а “гострим” (мінус)-кінцем – всередину клітини (рис. 1.3, А). Зв’язані з АТФ мономери актину приєднуються до плюс-кінців і гідролізують АТФ у складі філамента. Філаменти актину, який зв’язаний з АДФ є менш стабільні, мономери актину дисоціюють з мінус-кінця. Подовження плюс-кінців і деполімеризація мінус-кінців ретельно збалансовані по своїй швидкості, а також по швидкості зворотної подачі вивільнених мономерів до зростаючого кінця філамента. Ця “актинова карусель”, або тредміллінг (*Treadmilling*), визначає швидкість полімеризації актину (рис. 1.3, Б). Наростаючий філамент впирається в клітинну мембрану та постійно флуктуює і періодично утворюється проміжок між мембраною і кінцем філамента. Коли цей проміжок дозволяє, в нього вбудовується новий мономер актину і, не даючи мембрані повернутися на колишнє місце, рухає її вперед (рис. 1. 3. Б). Ця модель, відома як "еластичний броунівський храповик", адекватно поєднює рух мембрани з полімеризацією актину, і узгоджується з більшістю експериментальних досліджень. Інтенсивність "актинової каруселі" контролюють численні білки-регулятори актину (кофілін, профілін, β-тимозин, WASP, Scar / WAVE, кортактін та ін.), які діють у різних точках "каруселі", прискорюючи її або сповільнюючи. У свою чергу, вони регулюються білками, які сприймають і передають інформацію від поверхневих рецепторів, а саме малими ГТФ-азами родини Rho: Rac і Cdc42 регулюють, відповідно, ламелоподії і філоподії, а Rho-білок – утворення стрес-фібрил і міозин-залежну скоротливість [143]. Швидкість збільшення протрузій залежить від швидкості тредміллінгу актину, геометрії актинової мережі і, головне, від кількості вільних плюс-кінців, що штовхають мембрану вперед. Кількість таких кінців збільшується або завдяки кількості філаментів, або їх розгалуження, або регульованого видалення кеп-білків, які блокують приєднання мономерів. Кількість філаментів зростає, в основному, завдяки нуклеації та утворення філаментів *de novo* і, меншою мірою, завдяки розрізанню існуючих філаментів. Нуклеація є термодинамічно невигідною. Для її

прискорення та регуляції клітина використовує спеціальні білки: формін, Spire та Arp2/3. Оскільки форміни виконують також кепуючу функцію, а Arp2/3 – забезпечує галуження, ці білки слугують головними регуляторами динаміки актину при русі клітин [20].

Формін кепує наростаючий кінець актинового філамента, перешкоджаючи його полімеризації. При взаємодії з Rac/Cdc42 і профіліном припиняться інгібувальна дія форміну, однак він залишається зв’язаним з наростаючим філаментом [122].

Білки Spire забезпечують процес енуклеації, утворюючи затравки з чотирьох мономерів актину, після чого дисоціюють. Вони активуються фосфатидінозитолтрисфосфатом ($ФІФ_3$).

Комплекс білків Arp2/3 перебуваючи збоку готового філамента і формуючи розгалуження забезпечують нуклеацію актину, (рис. 1.3.Б). Він складається з семи субодиниць, дві з яких (Arp2 і Arp3) орієнтуються іншими п’ятьма так, що формують перший псевдо-актиновий димер, який ініціює полімеризацію бічного ланцюга [122]. Завдяки точній орієнтації цих білків і їх контактів, дочірні філаменти завжди ростуть плюс-кінцем до мембрани і під кутом до вихідного філаменту. У разі рецептор-залежної активації Arp2/3 беруть участь WASP, Scar (*suppressor of cAMP receptor*)/WAVE (*WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family verprolin homology protein*), кортактин та інші регулятори актину [122]. Активація WASP відбувається при зв’язуванні Cdc42 і $ФІФ_2$ на плазматичній мембрані завдяки припинення автоінгібування і переходу у відкриту конформацію [122] (рис. 1.3, Б). В активації WASP беруть участь й інші сигнальні білки, усі вони містять SH3-домени і зв’язуються з пролін-багатими послідовностями WASP. Крім WASP, полімеризацію актину регулюють білки WAVE/Scar. На відміну від WASP, вони не піддаються автоінгібуванню і активуються у складі білкового комплексу. Їхнім основним регулятором також є мала ГТФ-аза Rac.

Мала ГТФ-аза Ras і ФІ-3'-кіназа відіграють провідну роль у хемотаксичну сигналюванні [32]. Ras розподіляє сигнал в передньо-задньому напрямку клітини,

поляризуючи цитоскелет. Він запускає головні регулятори актину (малі ГТФ-ази Rac і Cdc42) і міозину II (ГТФ-аза Rho), викликаючи їх асиметричний розподіл та/або активацію [127]. Крім того, він потрібен для активації PI-3'-кінази, яка відіграє одну з ключових ролей у регуляції процесів полімеризації-деполімеризації актину [157]. Клітини використовують кілька взаємозамінних способів детекції зовнішніх градієнтів і передачі сигналу, які забезпечують спрямованість руху. Інші сигнальні каскади використовуються різними клітинами різною мірою. Вони включають тирозинкінази Src-родини, MAP-кінази і фосфоліпазу Cγ [177].

PI-3'-кіназа та її продукти беруть безпосередню участь у регуляції процесу утворення структур цитоскелету. При активації PI-3'-кіназа перетворює $ФІФ_2$ у $ФІФ_3$. Внутрішньоклітинна концентрація $ФІФ_3$ є результатом рецептор-залежного реципрокного розприділення PI-3'-кінази та фосфатази PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), які гідролізує ФІФ3. PTEN зв’язує мембранний $ФІФ_2$ спеціальним доменом і рівномірно роз приділяється на плазматичній мембрані клітин у стані спокою. При перетворенні $ФІФ_2$ у $ФІФ_3$ зменшується кількість ділянок зв’язування фосфатази PTEN на передньому краї клітини. У результаті PTEN переміщається з лідерного краю у задню частину клітини, де додатково гідролізує $ФІФ_3$ до $ФІФ_2$, створюючи собі нові ділянки зв’язування [54]. Механізм дії $ФІФ_3$ заснований на залученні з цитозолю і зв’язуванні білків, які містять домени плекстринової гомології (PH і PX).

Rac і Cdc42 контролюють активність факторів нуклеації і полімеризацію актину на передньому краї мігруючих клітин. Cdc42 запускає ріст філоподій і поляризацію цитоскелету [32, 127]. На лідируючій мембрані він активує WASP – головний чинник полімеризації актину [122]. Cdc42 і WASP використовують $ФІФ_2$ як активатор і забезпечують швидку фазу полімеризації актину у відсутності $ФІФ_3$. По мірі перетворення $ФІФ_2$ в $ФІФ_3$ вони дисоціюють і залишають мембрану. Накопичення $ФІФ_3$ веде до активації Rac-білка і забезпечує наступну фазу полімеризації актину. Rac запускає всі відомі чинники нуклеації актину: формін, Scar/WAVE і Spire. Посилення цього механізму досягається завдяки механізмів

зворотного зв'язку. Взаємний антагонізм Rac/Cdc42 і Rho забезпечує зміни, які призводять до поляризації цитоскелету. Механізм цього явища досі остаточно не зрозумілий. Відомо, що інгібування Rho-залежних процесів спричинює зміни, які спостерігаються при активації Rac, і навпаки, зміни, характерні для активації Rho, відбуваються при інгібуванні Rac [80]. Активація цих малих ГТФ-аз має асиметричний характер. Rac/Cdc42 функціонують на передньому краї клітини, де стимулюють динаміку актину і утворення ранніх фокальних комплексів. Rho працює в тілі клітини, він відповідає за збирання фокальних контактів в зоні ламели і активацію міозину II в задній частині, де найбільш необхідна скорочувальна активність [143].

Перебудови цитоскелету виконують провідну функцію при русі клітин. Вони відбуваються на всіх етапах руху і у всіх внутрішньоклітинних компартментах, включаючи ламелоподії, ламелли, тіло і задній край клітини. Рушійною силою є дендритна полімеризація актину на передньому краї. PI-3'-кіназний модуль і мала ГТФ-аза Rac слугують головними ланками хемотаксичної сигналізації, перебудов цитоскелету та регуляторних зворотних зв'язків. Ключові компоненти цього сигнального механізму є перспективними мішенями впливу нових лікарських сполук.

1.4. Молекулярні механізми антидіабетичної дії субстанцій, наявних у складі лікарських рослинах

На сьогодні відомо більш ніж 1200 рослин, які використовуються для лікування ЦД у всьому світі [33, 41, 99, 163]. Серед лікарських рослин, які включені до вітчизняної фармакопеї особливої уваги заслуговують: галега лікарська *(Galega officinalis)*, чорниця звичайна (*Vaccinium myrtillus)*, квасоля звичайна *(Phaseolus vulgaris)*, аралія маньчжурська (*Aralia mandshurica*), бузина чорна (*Sambucus nigra*), кульбаба лікарська (*Taraxacum officinale*), оман високий (*Inula helenium*), подорожник великий (*Plantago major*), звіробій звичайний (*Hypericum perforatum*),

кукурудза (*Zea mays*), кропива дводомна (*Urtica dioica*), липа круглолистна (*Tilia cordata*), евкаліпт (*Eucalyptus viminalis*), малина (*Rubus idaeus*), лопух великий (*Arctium lappa*), капуста (*Brassica oleracea*), льон звичайний (*Linum usitatissimum*), лимонник китайський (*Schizandra chinensis*), овес посівний (*Avena sativa*), сушениця болотна (*Gnaphalium uliginosum*), топінамбур (*Helianthus tuberosus*), хвощ польовий (*Equisetum arvense*), цикорій дикий (*Cichorium intybus*), шипшина корична (*Rosa cinnamomea*), манжетка звичайна (*Alchemilla vulgaris*), брусниця звичайна (*Vaccinium vitis-idaea*), горобина звичайна (*Sorbus aucuparia*), суниця лісова (*Fragaria vesca*), люцерна посівна (*Medicago sativa*), солодець голий (*Glycyrrhisa glabra*), елеутерокок колючий (*Eleutherococcus senticosus*), родіола рожева (*Rhodiola rosea*) та ін [176, 198].

Однак механізми дії більшості традиційних рослин, які використовуються у терапії ЦД є невідомими, що створює проблеми їхнього використання у стандартному лікуванні.

1.4.1. Механізми цукрознижувальної дії

Останнім часом набувають популярності дослідження дії біологічно активних компонентів лікарських рослин. Впродовж останніх років, із рослин відомих своєю антидіабетичний дією, було виділено й ідентифіковано близько 200 сполук, що мають підтверджену цукрознижуючу дію [93].

У таблиці 1.1. наведено різні класи сполук з гіпоглікемічною активністю, ізольованих із рослинних джерел.

Таблиця 1.1

Класи зареєстрованих антидіабетичних сполук

Класи сполук		Сполуки
Флавоноїди	Антоціанідини	ціанідин, дельфінідин, петинідин, пеонідин, пеларгонідин, мальвідин
	Антоціаніни	антоціанідини + залишок цукру (глюкоза, галактоза, арабіноза, рамноза, ксилоза)
	Флавони	Флавоноли: кварцетин, кемпферол, міріцетин, ізорамнетин, рутин (кварцетин-3-О-рутинозид), ізокварцетин (кварцетин 3-глікозид), епігенін Флаванони: сакуранетин Флаваноноли: таксифолін (дигідрокварцетин), дигідрокемпферол
	Ізофлавони	геністеїн
	Флавон-3-оли	катехіни (проантоціанідини), епікатехіни
	Ізофлаваноїди	фітоестрогени
Халькони		давідігенін, 2’,4’-дигідрокси-4-метоксидигідрохалькон
Таніни		галотаніни: 1,3,6-три-О-галоїл-2-хебулоїл-β-D-глюкопіранозид; 1,3,6-три-О-галоїл-2-схебулоїл естер-β-D-глюкопіранозид еллагітаніни: хебулова кислота, макатаніни А і В
Ксантони		мангіферин, белідіфолін, сверчірин, метилсвертіанін
Органічні кислоти		куареноєва кислота, п-кумарова кислота, ванілінова кислота, галова кислота, п-гідроксибензойна кислота
Похідні цинамонової кислоти		кавова кислота, ферулова кислота, хлорогенова кислота
Куркуміноїди		куркумін, деметоксикуркумін, бісдеметоксикуркумін
Алкалоїди		конофілін, піперин, піперноналін, дегідро піперноналін, галегін

Гіпоглікемічна дія біологічно активних компонентів лікарських рослин реалізується декількома шляхами, зокрема: завдяки абсорбції глюкози в кишечнику, збільшення секреції інсуліну підшлунковою залозою, інсуліноміметичної дії, інгібування продукції глюкози гепатоцитами, або посилення поглинання глюкози

периферичними тканинами через вплив на транспортери глюкози (GLUT), модуляції антиоксидантного захисту тощо [111].

Цукрознижуюючий ефект лікарських рослин часто пов’язують із наявністю у їхньому складі алкалоїдів. Зокрема виражена гіпоглікемічна дія галеги лікарської зумовлена гуанідинами – галегіном (ізометилгуанідин, (3-метилбут-2-ен-1-іл) гуанідин) та 4-гідроксигалегіном [53, 145]. Галегін став основою для цукрознижуючого препарату метформіну, що сьогодні є єдиним затвердженим антидіабетичним лікарським засобом на рослинній основі і набув широкого використання при лікуванні ЦД [14]. Біологічно активні речовини алкалоїдвмісного екстракту цієї рослини, пригнічують всмоктування глюкози у шлунково-кишковому тракті. Інгібування трансепітеліального транспорту глюкози може зумовлено впливом на функціонування натрійзалежного глюкозного котранспортера [110]. Окрім того, галегін може функціонувати як ліганд до імідазоліновового рецептору I2 (I2R). Зв’язування гуанідинів з I2R посилює фосфорилювання цАМФ-активованої протеїнкінази, яка виступає регулятором енергетичного гомеостазу та активує транслокацію GLUT-4 у м’язовій тканині, посилюючи таким чином поглинання глюкози скелетними м’язами [96].

Однак, алкалоїдвмісна фракція екстракту галеги лікарської є високотоксичною. Водночас, привертають увагу літературні дані, в яких вказується, про те, що цукрознижуючим ефектом володіє вихідний екстракт галеги, а також його безалкалоїдна фракція [194]. Суперечливий характер даних літератури щодо цукрознижуючої дії галеги лікарської зумовлює необхідність подальших експериментальних досліджень у цьому напрямку.

Дослідження молекулярних механізмів дії флавоноїдів, зокрема антоціанів здебільшого були проведені з використанням ціанідин-3-О-глюкозиду з чорної квасолі як широко розповсюдженого і доступного представника антоціанів. Встановлено, що ціанідин-3-О-глюкозид здатний знижувати чутливість клітин різних тканин до інсуліну, знижувати рівень цукру, вільних жирних кислот і тригліцеридів у крові, знижувати в крові концентрацію факторів запалення, таких,

як ФНП-α та ІЛ-6. Ціанідин-3-галактозид також проявляв інгібуючу дію на кишкову сахаразу і мальтазу, а також на амілазу підшлункової залози, що знижувало ступінь засвоєння багатьох цукрів. Доведено здатність антоціанів чорниці знижувати чутливість клітин до інсуліну у мишей завдяки активації АМР-активованої протеїнкінази (АМРК), що є регулятором процесів β-окислення жирних кислот і регулятором транспортера глюкози GLUT4 [149].

Інгібування ферментів, що беруть участь у процесах перетравлення вуглеводів, зокрема активності α-глюкозидази і α-амілази спричиняє повільніше надходження вуглеводів у кров і як наслідок зниження потреби інсуліну. Встановлено виражену інгібуючу дію антоціанідінів, ізофлавонів і флавонів на активність α-глюкозидази у дріжджів. Активність α-глюкозидази тонкого кишечника щурів інгібують флавоноїди, а також антоціаніди та ізофлавони [148]. Флавоноїдний глікозид кверцетин 3-O-β-D-ксилопіранозил - (1→2) - β-D-галактозид виділений з альстонії (*Alstonia scholaris)* інгібує тільки мальтазу [3].

Флавон С-глюкозид та хризоеріол 6-С-β-фукопіранозид виділені з приймочок кукурудзи (*Zea mays)* пригнічують утворення кінцевих продуктів глікозилювання [146]. У зернах кукурудзи було виявлено комплекс фенольних сполук, які здійснювали інгібуючий вплив на ксантиноксидазну і α-глюкозидазну активність *in vitro* та in *vivo* [112].

Низка флавоноїдів рослинного походження чинить інгібуючу дію на активність альдозоредуктази. Флавоноїдні глікозиди та флаванони ізольовані з мирти (*Myrcia multiflora)* інгібують альдозоредуктазу та *a*-глюкозидазу і виявляють гіпоглікемічну активність за умов алоксаніндукованого діабету [5]. Було ізольовано 6-деметоксикапіларіссин і 2’,4’-дигідрокси-4-метоксидигідрохілкон з етанольного екстракту тархуна лікарського (*Artemisia dracunculus L.)*, які мають альдозоредуктазоінгібуючу дію [94].

У складі галеги лікарської виявлено низку флавоноїдів. Серед них сім флавоноїдних речовин, які є похідними двох агліконів і цукрових компонентів – глюкози, рамнози і галактози. Один аглікон був ідентифікований, як 3,5,7,4’-

тетраоксифлавон (кемпферол), інший аглікон – 3,5,8,3’,4’-пентаоксифлавон [194], та такі флавоноїди, як пентаоксифлавон-5-глікозид, лютеолін, лютеонін-5-глікозид (галютеонін) [9, 10], нортерпеноїдний глікозид деарабінозил пнеумонантозиду, два флавонові триглікозиди маурітіанін і кверцетин 3-(2G-рамнозилрутинозид) та один новий ацетильований флавоновий триглікозид кемпферол 3-[2Gal-(4-ацетилрамнозил) робінобіозид [30].

Виявлено, лютеолін екстракту галеги лікарської інгібує активність α-амілази [55, 56]. Окрім того, флавоноїди сприяють підвищенню концентрації кальцію в крові, який впливає на секрецію інсуліну клітинами підшлункової залози. Гіпоглікемічну дію флавоноїдів обумовлюють наявність фенольного кільця у їхній структурі, а також бокові групи, їх положення, природа вуглеводневого залишку і ступінь глікозилювання цих сполук [188].

Доведено, що кемпферол у наномолярних концентраціях (оптимум при 10 нМ) захищає β-клітини підшлункової залози від хронічної гіперглікемії як *in vitro*, так і безпосередньо в острівцях підшлункової залози експериментальних тварин. При цьому відновлюється до норми експресія антиапоптичних білків Akt і Bcl-2, а також внутрішньоклітинний рівень АТФ і цАМФ, які зазвичай знижені при вказаній патології [93].

Екстракти із листя і стебел коріандру посівного *Coriandrum sativum* містять фенольні сполуки, флавоноїди, стероїди і дубильні речовин. Екстракти знижували рівень глюкози в сироватці щурів і підвищували секрецію інсуліну β- клітинами підшлункової залози [47]. Також експериментально підтверджено гіпоглікемічну, інсулін-рилізинг і інсуліноподібну активності екстракту насіння коріандру посівного [67].

Стимулювання периферичного поглинання глюкози в інсулін-чутливих й інсулін-нечутливих тканинах є одним з декількох механізмів, які контролюють рівень глюкози в крові, а отже, спрямована дія на цей процес, є одною з найперспективніших цілей у лікуванні цукрового діабету [69].

Родина рецепторів – активаторів проліферації пероксисом PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) належить до II типу ядерних гормональних рецепторів, що функціонують як фактори транскрипції, викликають проліферацію пероксисом у клітинах і беруть участь в регуляції метаболізму ліпідів, вуглеводів та білків [114]. Рецептори є лігандзалежними. Відомим потужним агоністом PPAR-γ є ліганди тіазолідиндіонів [106]. Після їх стимуляції специфічними лігандами, вони регулюють процес транскрипції за допомогою їх гетеродімеризації з РХР, ретиноїдним Х рецептором, із наступним звязуванням до пероксисомно-проліферативного елементу PPRE (*peroxisome prolixferator-response element*) [114]. Клінічні дані показують, що агоністи PPAR-γ – тіазолідиндіони модулюють гомеостаз глюкози за рахунок підвищення периферичного поглинання глюкози за рахунок підвищення активності і транслокації GLUT-4 в адипоцитах [4], та зменшення виходу глюкози з печінки [108].

PPAR- γ є однією з найважливіших мішеней для куркуміну, виділеного з куркуми (*Curcuma longa)* і 6-гінгеролу, природного аналога куркуміна одержаного з кореня імбиру (*Zingiber officinale*) [97]. У пошуках природнього агоніста PPAR-γ було виявлено [8], що природній продукт хонокіол з кори магнолії є стимулятором базального поглинання глюкози. Доведено, що флавоноїд рутин виділений з рути запашної (*Ruta graveolens*) підвищує експресію рецептора PPAR- γ [33].

Збільшення концентрації глюкози у крові стимулює вивільнення інсуліну β-клітинами підшлункової залози. 4-гідроксилейцин виділений з насіння гуньби сінної (*Trigonella foenum – graecum)* стимулює глюкозоіндуковане вивільнення інсуліну в ізольованих острівцевих клітинах у щурів, мишей і людини *in vitro* та *in vivo* [118].

Ізофлавони, широко відомі як фітоестрогени, можуть також бути потенційними антидіабетичними сполуками. Наприклад, геністеїн, що міститься в соєвих продуктах сприяє підвищенню глюкозо-стимульованої екреції інсуліну в клітинних лініях та панкреатичних острівцях мишей [52]. Механізм дії ізофлавонів включає активацію цАМФ / ПК А сигнального каскаду, що призводить до

підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} і призводить до стимуляції секреції інсуліну.

Крім того, *in vitro* показано, що геністеїн через ПК С здатний активувати експресію SHARP-2 (*split- and hairy-related protein-2*), компоненту регуляції рівня глюкози в крові. Таким чином, геністеїн використовує обхідний шлях регуляції рівня глюкози, минаючи інсулін-залежний етап. В експериментах на тваринах було виявлено, що високі дози геністеїну захищають острівцеві клітини підшлункової залози від дії високих концентрацій глюкози у щурів з індукованим діабетом. Знижується також втрата ваги тварин та нормалізується рівень інсуліну в крові [52, 92].

Аналіз літературних даних вказує на те, що біологічно активні компоненти лікарських рослин, можуть виявляти свою цукрознижуючу дію впливаючи на активність ключових ферментів обміну вуглеводів, транспорт глюкози та функції рецептора до інсуліну, порушення яких відіграють важливу роль в патогенезі цукрового діабету.

1.4.2. Механізми антиоксидантної дії

Одним з обов’язкових компонентів комплексної терапії ЦД та його ускладнень є застосування антиоксидантної терапії, яку правомірно можна віднести до патогенетичної, оскільки роль АФО в патогенезі цього захворювання є безсумнівною [170]. Рослини, що містять природні антиоксиданти можуть запобігати генерації АФО і тим сприяти збереженню функцій β-клітин. Рослинні поліфеноли, зокрема, флавоноїди та таніни здатні зв’язувати і виводити вільні радикали, пригнічувати гідролітичні і окислювальні ферменти, проявляють протизапальну дію і мають антидіабетогенний потенціал [6].

Основними діючими компонентами екстрактів лікарських рослин, які володіють антиоксидантними властивостями є: флавоноїди [186], вітамін Е [76], жирні кислоти [135], фітол [196], сквален [77], та ін.

Флавоноїди, і вітамін Е слугують пасткою електронів та вільних радикалів, а отже здатні пригнічувати ланцюгові реакції вільнорадикального окислення біосубстратів [186]. Флавоноїди та їх похідні є гетероциклічними сполуками, що здатні зменшувати проникність і ламкість стінок кровоносних судин завдяки антиоксидантній і мембраностабілізуючій дії [115, 144]. Флавоноїд лютеолін, який виявлено у складі екстракту галеги лікарської ефективно знижує вміст продуктів ПОЛ [101]. Ягоди чорниці (*Vaccinium myrtillus*) є одним з найбагатших природних джерел антоціанів – флавоноїдів з потужною антиоксидантною дією.

Антидіабетичний та антиоксидантний ефект цибулі ріпчастої зумовлений наявністю S-метил цистеїн сульфоксиду (SMCS), дія якого вивчались на моделі аллоксаніндукованого діабету у щурів [8]. Ймовірний механізм дії SMCS полягає у стимуляції виділення інсуліну і завдяки його антиоксидантній активності [24].

Доведено, що антиоксидантна активність насичених жирних кислот зростає зі збільшенням довжини ланцюга від октанової кислоти до міристинової кислоти (C8-C14), з подальшим зниженням антиоксидантної активності. Потужніша антиоксидантна активність властива ненасиченим жирним кислотам, порівняно з насиченими, що зумовлено наявністю подвійних зв’язків у їхній структурі [135].

Антиоксидантні властивості фітолу зумовлені наявністю у його складі гідроксильної групи [40].

Скавенджером гідроксильних радикалів також виступає сквален, який є ефективнішим, ніж ендогенний відновлений глутатіон (GSH). Сквален є ліпофільною сполукою, і тому може легко проходити через ліпідний бішар у внутрішньоклітинні компартменти, що сприяє прояву його антиоксидантних властивостей [77].

Враховуючи основні патогенетичні механізми, що беруть участь у розвитку ЦД та його ускладнень обґрунтованим терапевтичним підходом їх лікування й профілактики є використання антиоксидантів [98].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Умови проведення досліджень

Дослідження були проведені на білих безпородних щурах віком 4-5 місяців, 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). В експериментах було задіяно 380 тварин.

Експериментальний цукровий діабет було індуковано внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США) з розрахунку 5,5 мг (у 10 мМ цитратному буфері, pH 5,5) на 100 г маси тіла тварини. Для експерименту використовували тварин з концентрацією глюкози 14 ммоль/л і вище (після 18-годинного голодування). Через два тижні після індукції цукрового діабету тваринам *per os* вводили безалкалоїдну фракцію екстракту галеги лікарської (БФ ЕГЛ), яку стабілізували застосовуючи біоПАР, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17 (далі по тексту – E^{ps}) у концентрації 0,6 г/кг та 1,2 г/кг маси тіла впродовж 14 діб.

Тварин було поділено на групи: перша – контроль; друга – контрольні тварини, яким впродовж 14 днів *per os* через зонд вводили E^{ps}; третя – тварини з ЕЦД; четверта – тварини з ЕЦД, яким вводили досліджуваний екстракт за вищезазначеною схемою. Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 15-й день експерименту.

2.2. Характеристика об’єкту досліджень

Об’єктом досліджень слугували лейкоцити периферичної крові, клітини білого ростка кісткового мозку, клітини підшлункової залози й плазма крові щурів у нормі, за ЕЦД і на фоні введення E^{ps}. Забір крові для досліджень проводили з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100).

2.3. Отримання безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської

Інтродуковану в Ботанічному саду Львівського національного університету імені Івана Франка надземну частину галеги лікарської збирали в період цвітіння, висушували при кімнатній температурі в темряві. Вихід повітряно-сухої маси із 4 кг сирої трави становить 1 кг.

Виготовення етанольного екстракту здійснювали шляхом настоювання 30 г подрібненої надземної частини галеги лікарської у 96% етиловому спирті (підкисленому 0,1 н хлоридною кислотою до pH 2) впродовж 12 год у співвідношенні 1:5 при кімнатній температурі та упарювали у вакуумі за допомогою роторного випарювача LABOROTA 400 (Heidolph, Німеччина) при температурі +50…+55°C до одержання густого залишку екстракту. До максимально упареного етанольного екстракту масою 14 г додавали 9 мл H_2O (до отримання однорідної маси) та 9 мл хлороформу. Після перемішування (10 хв) зразки центрифугували впродовж 10 хв при 1500 об/хв. Одержані фракції: 1 – водну (темно-коричневого забарвлення) 2 – хлороформну (темно-зеленого забарвлення) упарювали у вакуумі при температурі +40…+50°C до одержання сухого залишку відповідно масою 3-3,5г та 1-1,5г. Для досліджень використовували водну суспензію упареної хлороформної (безалкалоїдної) фракції, як такої, що є нетоксичною. Органолептичні і фізико-хімічні показники досліджуваного екстракту (опис, розчинність, сухий залишок,

втрата в масі при висушуванні) нами було визначено за загально відомими методиками згідно з Державною Фармакопеєю України [181].

2.4. Виділення поверхнево-активного біокомплексу PS та стабілізація безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської

У роботі використовували поверхнево-активні продукти біосинтезу культури *Pseudomonas* sp. PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України.

Культивування штаму-продуцента проводили в колбах Ерленмейєра (750 мл), з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 30 °С на рідкому поживному середовищі (г/л): $NaNO_3$ – 4,0; K_2HPO_4 x $3H_2O$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0,5; цитрат Na – 2,0. Джерело Карбону – гліцерин - 30 г/л. Термін культивування – 5 діб.

Поверхнево-активний біокомплекс PS виділяли зі супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 способом кислотного осадження (10% HCl) за pH 3,0. Отриманий осад витримували за 4 °С протягом ночі, відділяли центрифугуванням (8 000 об/хв, 20 хв), сушили у вакуумі до постійної маси.

Стабілізацію проводили додаванням до вихідної суміші, отриманої у разі додавання води до безалкалоїдної фракції галеги лікарської біокомплексу PS 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 токсикологічнім паспортом, середньосмертельна доза (ЛД50) біокомплексу PS за умови внутрішньошлункового введення культуральної рідини для білих щурів і мишей становить більше 10 г/кг, отже, цей біокомплекс належить до речовин 4 класу небезпеки [218]. З огляду на це, застосовання концентрації (0,6–3,3 г/л) біокомплексу PS є нетоксичними для тварин і людини.

2.5. Аналіз якісного і кількісного складу стабілізованої безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської

З метою виявлення алкалоїдів нами було використано загальноосадові реактиви на алкалоїди. Застосування таких реактивів ґрунтується на здатності алкалоїдів утворювати нерозчинні прості або комплексні солі з кислотами, солями важких металів, гетерополікислотами.

Кілька краплин досліджуваного екстракту наносили на предметні скельця і висушували їх на повітрі. Залишок розчиняли в 1-2 краплях 0,1н HCl. Поряд поміщали 1-2 краплі відповідного реактиву і сполучали краплі за допомогою скляної палички. При наявності алкалоїдів на місці стикання крапель утворюється осад або каламуть.

Осадження алкалоїдів здійснювали загальними алкалоїдними реактивами:

- Реактив Бушарда (1 г I, 2 г KI в 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 у 100 мл H_2O) – з більшістю алкалоїдів у слабопідкислених або нейтральних розчинах утворює білі або жовтуваті осади;
- Реактив Драгендорфа (BiI_3 + KI ($KBiI_4$) – розчиняли 8 г основного нітрату вісмуту в 20 мл 30% HNO_3, у розчин повільно вливали розмішуючи, 27,2 г KI в 30 мл води та залишали на деякий час. Коли KNO_3 викристалізується, розчин зливали з кристалів і доводили до 100 мл). Реактив Драгендорфа з сірчанокислими розчинами алкалоїдів утворює оранжево-червоні або цегляно-червоні осади.
- Реактив Зонненштейна (1% розчин $H_3PO_4 \times 12MoO_3 \times 2H_2O$). Реактив Зонненштейна – один з найбільш чутливих реактивів на алкалоїди: він утворює жовтуваті осади, які внаслідок відновлення молібденової кислоти набуває через деякий час синього або зеленого забарвлення.

2.6. Хроматомасспектрометричне визначення компонентного складу стабілізованої безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської

Компонентний склад речовин безалкалоїдної фракції визначали за допомогою хроматографа Agilent Technology 6890N з мас-спектрометричним детектором 5979B. Умови аналізу: хроматографічна колонка капілярна HP-5MS довжиною 30 м і внутрішнім діаметром 250 мкм, фазою 0,25 мкм. Як газоносій використовували Гелій за постійної швидкості потоку 1,5 мл/хв і об'ємі проби 1 мкл. Інжектор – автоінжектор 7683B, Split 20:1, температура випарювача 250 °C. Температуру термостата програмували від 75 °C (протягом 2 хв) з нагріванням 15 °C/хв до 300 °C (протягом 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 24 хв. Процентний 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.

2.7. Морфологічні дослідження клітинних елементів крові

2.7.1. Приготування мазків крові [213]

Для приготування мазків крові використовували шліфоване предметне скло зі зрізаними кутами. Мазки висушували на повітрі, фіксували метанолом (3 хв), щоб запобігти руйнуванню формених елементів крові і закріпити їх на склі, та фарбували.

2.7.2. Фарбування мазків за Романовським-Гимзою [213]

Сухі мазки периферичної крові фарбували після попереднього фіксування в абсолютному метиловому спирті (3 - 5 хв).

Робочий розчин фарби готували з розрахунку 1–2 краплі готової фарби (еозин жовтий – 0,8 г та метиленовий синій – 250 мл, азур 2–3 г, гліцерин – 250 мл) на 1 мл дистильованої води. Фарбу наливали на мазок якомога вищим шаром і залишали на 30–35 хв. Потім мазки промивали проточною водою і висушували на повітрі.

2.8. Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом [156]

Для визначення концентрації глюкози використовували аналітичний набір для ферментативного визначення глюкози в крові «Філісіт-Діагностика» (Україна). Принцип методу базується на реакції окиснення глюкози до глюконової кислоти з утворенням пероксиду водню (H_2O_2). У присутності пероксидази H_2O_2 реагує з фенолом та 4-амінофеназолом з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації глюкози в крові.

Для проведення аналізу до 0,9 мл стабілізуючого розчину (1,34% розчин щавлевокислого натрію у 0,85% NaCl) вносили 0,1 мл цільної крові. Проби центрифугували для осадження еритроцитів при 3000 об/хв впродовж 5 хв. Для приготування дослідної проби відбирали 0,1 мл надосадової рідини та додавали 1 мл розчину ензимів. Для приготування калібрувальної проби замість зразка додавали 0,1 мл калібрувального розчину глюкози. Вимірювання проводили проти холостої проби, яка містила 0,1 мл фізіологічного розчину. Через 20 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 498 нм. Розрахунок концентрації глюкози (в ммоль/л) здійснювали за формулою:

$$C = \frac{E_1 \cdot 10}{E_2},$$

де E_1 і E_2 – оптичні густини дослідної та калібрувальної проб відповідно; 10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л.

2.9. Визначення толерантності клітин до глюкози

ГТТ проводили вранці після 18-годинного голодування тварин. Навантаження глюкозою здійснювали шляхом перорального введення розчину глюкози у розрахунку 1 г на 1 кг маси тіла. До навантаження та кожні 10 хв впродовж 1 год після навантаження проводили забір крові з хвостової вени щурів. Рівень глюкози визначали глюкозооксидазним методом. Будували графік – глікемічну (цукрову) криву за точками: натще – 0 точка, через 10 хв після прийому глюкози – 1-ша точка, через 20 хв – 2-га точка, через 30 хв – 3-тя точка, через 40 хв – 4-та точка, через 50 хв – 5-та точка, через 60 хв – 6-та точка, і т.д. упродовж 2 годин.

Як критерій сумарної відповіді на стандартний глюкозотолерантний тест розраховували інтегральний показник площі під глікемічними кривими – *AUCglu* (*area under a curve*), який відображає загальне підвищення концентрації глюкози. *AUCglu* розраховували за допомогою правила трапецій [166].

2.10. Приготування гемолізатів еритроцитів

Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 5 хв. Плазму відбирали. Еритроцити тричі промивали охолодженим фізіологічним розчином (0,9% розчин NaCl) при 3000 об/хв по 5 хв. Відмиті еритроцити гемолізували дистильованою водою, додаючи до 1 мл еритроцитарної маси 2 мл дистильованої води. Суміш збовтували протягом 10 хв і центрифугували при 8000 об/хв для видалення стром еритроцитів. Відбирали супернатант.

2.11. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну [158]

Вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) в еритроцитах визначали колориметричним методом, який ґрунтується на кислотному гідролізі кетоамінного зв'язку в присутності щавелевооцтової кислоти. У результаті реакції утворюється 5-оксиметилфурфурол, який, взаємодіючи з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворює забарвлений комплекс, інтенсивність якого визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 443 нм.

До 2 мл гемолізату додавали 1 мл 0,3 М щавелевооцтової кислоти. Суміш інкубували при 95°С протягом 1 год, охолоджували і додавали 1 мл 40% трихлороцтової кислоти (ТХО), струшували і центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 0,05 М ТБК та інкубували при 40°С протягом 40 хв. Через 20 хв вимірювали оптичну густину досліджуваного зразка при довжині хвилі 443 нм. Значення екстинкції 0,029 відповідає концентрації HbA1c, що становить 1%.

2.12. Імуноферментний аналіз вмісту інсуліну, С-пептиду та фактора некрозу пухлин альфа

Вміст інсуліну, С-пептиду та ФНП-α у плазмі крові щурів визначали імуноферментним методом застосовуючи стандартні набори ELISA фірми Sigma (USA) згідно інструкцій фірм-виробників.

2.13. Світлова мікроскопія клітин підшлункової залози

Для гістологічного дослідження з допомогою світлової мікроскопії зразки селезінової частини підшлункової залози фіксували у рідині Буена впродовж 12 год. при температурі +4° С. Після фіксації матеріал зневоднювали за стандартною методикою в етанолі з висхідною концентрацією і заливали у гістомікс.

Для дослідження за допомогою світлової мікроскопії та проведення морфометрії гістологічні зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксиліном Майєра і еозином [190], для верифікації β-клітин застосовували фарбування хром-гематоксиліном за Гоморі [210] та альдегід-фуксином за Gabe [199].

Дослідження мікропрепаратів, морфометрію й 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 (NIH, USA). Визначали показник щільності розташування острівців (кількість острівців Лангерганса на стандартній площі (N/10мм^2)), їх індивідуальну площу (S, мкм^2), діаметр (Di, мкм), об'єм (Vi, мкм^3), кількість β-клітин на 1000 мкм^2. 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 $D = \sqrt{ab}$ [164]. Беручи до уваги, що острівці підшлункової залози є сфероїдною структурою, для визначення середнього діаметру острівців використовувалася формула Fullman [164]:

$$D = \frac{\pi}{2} \times \frac{N}{\frac{1}{d1} + \frac{1}{d2} \cdots \cdots \frac{1}{dN}},$$

де N - є загальною кількістю вимірів. Даний діаметр використовувався для визначення середнього об'єму острівців підшлункової залози за формулою:

$$V = \frac{4\pi}{3} \times \left(\frac{D}{2}\right)^3 \quad [164].$$

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

2.14. Виділення сумарної фракції лейкоцитів з периферичної крові щурів

Загальну фракцію лейкоцитів (далі – лейкоцити) виділяли у градієнті густини фікол-тріомбраст (ρ = 1,076–1,078 г/см^3) [16]. У пластикову пробірку вносили 3 мл фікол-тріомбрасту і зверху нашаровували 5–7 мл крові, попередньо розведеної забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) (pH 7,4) у співвідношенні 1:1. Центрифугували при 1000 об/хв впродовж 25 хв. Після центрифугування 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%.

2.15. Визначення кількості лейкоцитів [213]

У пробірку вносили 0,4 мл рідини для розведення (3% CH_3COOH, підфарбований метиленовим синім; CH_3COOH лізує еритроцити, а метиленовий синій фарбує ядра лейкоцитів) і 0,02 мл капілярної крові з антикоагулянтом. Суміш ретельно перемішували, заповнювали камеру Горяєва і залишали на 1–2 хв для осідання форменних елементів. Підрахунок клітин проводили у 100 великих (1600 малих) квадратах.

Лейкоцити підраховували у п’яти великих (80 малих) квадратах. Розрахунок проводили пам’ятаючи, що об’єм малого квадрата дорівнює 1/4000 мм^3. Кількість лейкоцитів в 1 мкл крові обчислювали за формулою :

$$x = \frac{a \cdot 4000 \cdot в}{б}, \text{ де}$$

x – кількість лейкоцитів в 1 мкл крові; ***а*** – кількість клітин, що були підраховані у певній кількості малих квадратів; ***б*** – кількість малих квадратів, в яких рахували еритроцити; ***в*** – розведення крові.

2.16. Флуоресцентно–мікроскопічне дослідження рівня генерації активних форм оксигену у лейкоцитах периферичної крові щурів.

Продукцію АФО в лейкоцитах крові вимірювали використовуючи 2′,7′-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетат, який здатен спонтанно проникати через мембрану всередину клітини. За участі неспецифічних естераз, локалізованих в цитозолі він перетворюється у нефлюоресцентну сполуку – дихлородигідрофлуоресцеїн, який після окиснення перетворювався у флуоресціюючий 2′,7′-дихлорфлуоресцеїн. Окиснення дихлородигідрофлуоресцеїну відбувається за дії гідроксильних (HO•), пероксильних (ROO•) радикалів, а також оксиду нітрогену (NO) та пероксинітриту ($ONOO^-$)[66].

Лейкоцити ($2 \cdot 10^6$ клітин) ресуспендували у буферному розчині (10 мМ HEPES/NaOH (pH = 7,4), 140 мМ NaCl і 2,5 мМ $CaCl_2$) та інкубували з 2′,7′-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетатом у концентрації 3 мкмМ впродовж 45 хвилин при температурі 37°C. Клітини промивали у буферному розчині. Зразки аналізували на флуоресцентному мікроскопі Nikon Optiphot 2 («Nikon», Японія). Для фіксації зображення використовували відеокамеру для мікроскопа (DCM310).

Інтенсивність флуоресценції 2′,7′-дихлорфлуоресцеїну (довжина хвилі збудження – 515 нм, емісії 535 нм) виражали в умовних одиницях (у.о.). Для аналізу та обробки зображень використовували програму Image J 1.47t.

2.17. Отримання лізатів лейкоцитів

Лізис лейкоцитів проводили буфером такого складу: 10 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 1% тритон Х-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ NaF, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (“Fluka”, Швейцарія), 5 мМ бензамідин (“Sigma”, США), 10 мкг/мл апротиніну (“Sigma”), 10 мкг/мл лейпептину (“Sigma”), 2 мкг/мл пепстатину (“Fluka”), 0,25 мМ

Na_3VO_4 1:10 за об'ємом. На 10 млн лейкоцитів давали 350 мкл приготовленого буферу. Лізис проводили протягом 60 хв на льодяні бані.

2.18. Методи визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків

2.18.1. ТБК-позитивні продукти [217]

Принцип методу ґрунтується на активації ПОЛ іонами двохвалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі в кислому середовищі малоновий диальдегід реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм.

До 0,2 мл лізатів лейкоцитів додавали 3 мл 10 мМ К,Na-фосфатного буферу, приготованого на 125 мМ KCl (pH 7,4). Для індукції ПОЛ додавали 0,5 мл 1мМ $KMnO_4$, та двічі з інтервалом у 10 хвилин по 0,5 мл 10мМ $FeSO_4$. Реакцію зупиняли додаванням 1мл 20 % ТХО. Осад відцентрифуговували 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 на водяній бані при температурі 100°С протягом 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, перемішували і центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв. Вимірювання екстинкції проводили у верхньому бутаноловому шарі при λ=532 нм.

Обрахунок проводили за формулою:

$$[\text{ТБК - позитивні продукти}] = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V_3 \cdot C}, \text{ де}$$

E – екстинкція дослідної проби;

ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу МДА з ТБК, 156000 $М^{-1} \cdot см^{-1}$;

V_1 – об'єм бутанолу;

V_2 – лізату;

V_3 - об'єм супернатанту;

С – концентрація білка в досліджуваній пробі, $мг \cdot мл^{-1}$.

Отримані результати виражали в мкмоль·мг$^{-1}$ білка.

2.18.2. Карбонільні групи білків [200]

В процесі окиснювальної модифікації білків плазми крові в радикалах залишків аліфатичних амінокислот утворюються альдегідні і кетонні групи. Останні взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєструються при 370 нм, а основного характеру – при 430 нм.

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 2н HCl і 1мл 10% ТХО. У контрольну пробу вносять замість 2,4-ДНФГ 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 8М розчину сечовини, інкубували 5 хв у киплячій водяній бані до повного розчинення.

Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували при 370 та 430 нм. Вміст фенілгідразонів нейтрального характеру (370 нм) та основного характеру (430 нм) розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції $\varepsilon = 22{,}000$ см$^{-1}$ × М$^{-1}$ та виражали в у.о. ×г$^{-1}$ білка.

2.19. Методи визначення активності ензимів системи антиоксидантного захисту

2.19.1. Визначення активності супероксиддисмутази [226]

Принцип методу визначення активності СОД (КФ 1.15.1.1) грунтується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, які утворюються у результаті аеробної взаємодії НАДН і

феназинметасульфату. В результаті цієї реакції нітросиній тетразолій відновлюється з утворенням гідразинтетразолію (нітроформазану). За присутності СОД відсоток відновлення нітросинього тетразолію знижується. Кількість утвореного гідразинтетразолію визначають за кількістю нітроформазану – продукту відновлення нітротетразолію синього оцінювали активність ферменту.

Реактиви:

1. Інкубаційна суміш, до складу якої входять 39 мМ ЕДТА-Na, 114 мМ нітротетразолій синій (мета-форма), 54 мМ феназинметасульфат, розчинені у 0,15 М фосфатному буфері (pH 7,8).

2. Розчин НАДН (152 мг НАДН розчиняють в 100 мл трис-ЕДТА буферу, pH 8,0).

Активність СОД визначали в супернатанті з розрахунку: 2 мл інкубаційної суміші; 0,1 мл розчину НАДН. У холосту пробу замість супернатанту вносили дистильовану воду. Через 10 хв проводили вимірювання екстинкції при λ =540 нм проти води у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Активність ферменту визначали за відсотком блокування утворення нітроформазану. Розрахунки проводили за формулою:

$$\%\ \text{блокування} = \frac{E_{\text{х.пр.}} - E_{\text{д.пр.}}}{E_{\text{х.пр.}}} \times 100\%, \text{ де}$$

$E_{\text{х.пр.}}$ та $E_{\text{д. пр.}}$ - екстинкція холостої та дослідної проб, відповідно.

Супероксиддисмутазну активність виражали в умовних одиницях (1 ум. од.=50% блокування реакції утворення нітроформазану) на 1 мг білка. Отримані значення переводили у Міжнародні одиниці (U) відповідно до значень калібрувальної кривої.

2.19.2. Визначення активності каталази [191]

Принцип методу базується на здатності H_2O_2 утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення перекисних сполук молібдену залежить від кількості H_2O_2 в розчині, тобто від активності каталази (КФ 1.11.1.6) в пробі.

Реактиви:

1. 0,03% розчин H_2O_2;
2. 0,25 н розчин H_2SO_4;
3. 4% розчин амоній молібдату на 0,025 н H_2SO_4.

Каталазну реакцію запускали додаванням 0,1 мл лізату лейкоцитів до 2 мл 0,03% розчину H_2O_2. Холоста проба містила 1 мл розчину амоній молібдату 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 амоній молібдату. У холосту пробу вносили 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 0,1 мл лізату.

Проби центрифугували 10 хв при 10000g. Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично при λ=410 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l}$$ (мкмоль H_2O_2 за 1 хв на 1 мг білка), де

ΔE - різниця екстинкції холостої та дослідної проб;

V - загальний об'єм реакційної суміші в кюветі, мл;

n - розведення вихідного екстракту;

ε - молярний коефіцієнт екстинкції комплексу H_2O_2 з амоній молібдатом при λ= 410 нм, рівний 22200 $M^{-1}\cdot см^{-1}$, в розрахунках використовували величину мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражену як 22,2 $см^2$/мкмоль;

С – концентрація білка, мг/мл;

t- час реакції (10 хв);

α - об'єм зразку, мл;

l- довжина оптичного шляху, см.

2.19.3. Визначення активності глутатіонпероксидази [201]

Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) вимірюється за швидкістю окиснення відновленого глутатіону у присутності гідроперекису третинного бутилу. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з реактивом Еллмана (0,01М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі) з утворенням кольорового продукту - тіонітрофенільного аніону. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з реактивом Еллмана.

Реактиви:

1. 0,1М трис- HCl буфер, pH 8,5, що містить 6 мМ ЕДТА та 12 мМ азид натрію. Безпосередньо перед дослідом на цьому розчині готують 4,8 мМ розчин глутатіону (GSH);
2. 0,1М трис- HCl буфер, pH 8,5;
3. 20% ТХО;
4. Реактив Еллмана – 0,01 М ДТНБК на метанолі;
5. Гідроперекис третинного бутилу 20 мМ.

0,1 мл лізату лейкоцитів, що містив 1мг білка, інкубували з 0,83 мл 0,1 М трис-HCl буферу, що містив 6 мМ ЕДТА, 12 мМ NaN_3 і 4,8 мМ GSH (pH 8,5) при 37°С протягом 10 хв. До проби додавали 0,07 мл 20 мМ гідропероксиду трет-бутилу та інкубували 5 хв (t - час інкубації). Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл холодного

20%-го розчину ТХО. Усі додані компоненти складають об'єм проби, який позначимо через а. Для приготування контрольної проби додавали всі перелічені вище реагенти, однак осадження білків ТХО проводили без попередньої інкубації лізату з трис-HCl буфером, який містив ЕДТА, NaN_3, GSH та трет-бутил.

Пробу з доданою ТХО центрифугували при 10000 g 10 хв. До 2 мл 0,1 М трис-HCl буферу (pH 8,5) додавали 0,02 мл супернатанту (V_{super}) і 0,02 мл реактиву Еллмана. Об'єм отриманої реакційної суміші позначимо як b.

Через 5 хв проби фотометрували при довжині хвилі 412 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Використовуючи наведені в тексті позначення, обрахунок глутатіонпероксидазної активності проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot a \cdot b}{\varepsilon \cdot V_{ліз} \cdot V_{super} \cdot C \cdot t \cdot l}, \text{ де}$$

ΔE - різниця екстинкції холостої та дослідної проб;

а - об'єм трис-HCl буферу, гідропероксиду трет- бутилу, розчину ТХО;

b - об'єм супернатанту, трис-HCl буферу та реактиву Елмана;

ε - молярний коефіцієнт екстинкції тіонітрофенільного аніона, рівний 11400 $M^{-1} \cdot см^{-1}$, в розрахунках використовували величину мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражену як 11,4 $см^2$/мкмоль.

V_{super} – об'єм супернатанту, мл;

$V_{ліз}$ - об'єм лізату, мл;

t- час реакції;

C - концентрація білка, мг/мл;

l – довжина оптичного шляху.

Отримані результати виражали в нмоль GSH за 1хв на 1 мг білка.

2.20. Визначення сумарної активності NO-синтази

Для визначення сумарної активності NO-синтази (КФ 1.14.13.39) до відібраного супернатанту з лізатів лейкоцитів додавали 10 мМ HEPES буфер, що містив 1 М $MgCl_2$, 1 М $CaCl_2$, 3 мМ L-аргінін та 250 мМ НАДФН(H^+). Як контроль використовували проби, що містили повну субстратну суміш та дистильовану воду. Після 30 хвилинної інкубації зразків при 37°С зупиняли реакцію додаванням 96% етилового спирту в пропорції 1:2. Центрифугували 20 хвилин при 3000 об./хв для осадження білків (20°С). В епендорфівські пробірки вносили по 100 мкл супернатанту та 100 мкл реактиву Гріса (який складається з рівних частин 0,05 % розчину N-(1-Нафтил) етилендиамін дигідрохлориду і 1% розчину сульфаніламіду в 5% HCl). Інкубували 30 хвилин при 37°С, після чого переносили зразки у мікропланшети. Вимірювали світлопоглинання при λ=540 нм на планшетному рідері (Epoch, Biotek, США).

Сумарну активність ензиму визначали за різницею утворення нітритів з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності ензиму до вихідного рівня активності в досліджуваних зразках [39]. Активність NOS у пробі виражали в нмолях новоутвореного NO^{2-} за 1 хв на 1 мкг білка.

2.21. Визначення вмісту нітрит-аніонів [103]

Вміст нітрит-аніону (NO^{2-}) визначали в зразках лізатів лейкоцитів з використанням реактиву Гріса. Метод полягає у визначенні інтенсивності забарвлення комплексу солі діазонію, утвореного у результаті реакції NO^{2-} з сульфаніламідом та N(1-нафтил)-етилендіаміном у кислому середовищі.

Депротеїнізацію проводили додаванням до зразків 96% етанолу з наступним центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 20 хвилин. У лунки планшети вносили 100 мкл отриманого супернатанту та аналогічний об’єм реактиву Гріса. Абсорбцію

вимірювали при λ=540 нм на планшетному рідері (Epoch, Biotek, США) після преінкубації при температурі 37°С протягом 30 хв. Контролем слугували проби, які замість зразка містили 100 мкл дистильованої води. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували з використанням стандартних розчинів нітриту натрію.

2.22. Визначення вмісту нітрат-аніонів [103]

Концентрацію нітрат-аніону (NO^{3-}) визначали за різницею між сумарним вмістом стабільних метаболітів оксиду нітрогену та вмістом NO2–. Депротеїнізацію зразків проводили за схемою, описаною у п. 3.11.2..

Для визначення сумарного вмісту метаболітів NO проводили відновлення нітратів до нітритів, як відновник використовували ванадій (III) хлорид (VCl_3). У лунки планшету вносили 100 мкл супернатанту, додавали 100 мкл VCl_3, а також швидко вносили 100 мкл реактиву Гріса. Вміст лунки інкубували 30 хв при температурі 37ºС. Абсорбцію вимірювали при λ=540 нм на планшетному рідері (Epoch, Biotek, США), у якості контролю використовували проби, які замість зразка містили 100 мкл дистильованої води. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували із використанням стандартних розчинів нітрату натрію.

2.23. Визначення концентрації білка за методом Лоурі

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [95]. Результат виражали у мг білка на мл зразка.

2.24. Методи дослідження реорганізації актинового цитоскелету

2.24.1. Кількісна оцінка вмісту полімеризованого актину методом протокової цитометрії з використанням фалоїдину міченого ТРІТЦ

Лейкоцити (2×10^6) фіксували у 4% розчині параформальдегіду (15 хв при 4°С), відмивали у ЗФР та інкубували з 0,1% Тритон-Х-100 («Merck», Німеччина) впродовж 10 хв при 4 °С. Для візуалізації структури фібрилярного актину використовували фалоїдин, мічений ТРІТЦ (тетраметил родамін-5-ізотіоціонат) у концентрації 50 мкг/мл (Sigma, США) у розчині 0,02% бичачого сироваткого альбуміну (БСА), та витримували 30 хв у темряві [21]. Детекцію здійснювали за допомогою лазерного проточного цитометра (FACSCalibur, Becton Dickinson, США). Інтенсивність випромінювання зразків реєстрували за каналом FL2 (540–573 нм). Середню інтенсивність флюорисценсії (середнє арифметичне значення сили свічення суспензії клітин (2×10^4)), визначали за допомогою програмного забезпечення Cytomation Summit v3.1. (Cytomation, Inc., США) і виражали в у.о.

2.24.2. Фракціонування актину у лізатах лейкоцитів [85, 86, 87]

Лізис лейкоцитів ($1,5 \times 10^6$) проводили в 250 мкл буферу, що містив 0,5% Тритон Х-100, 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 2мМ ЕГТА, 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5) та коктейль інгібіторів протеаз (“Sigma”, США) протягом 10 хвилин (4°С).

З метою вивчення процесів реорганізації актинового цитоскелету, було застосовано наступну схему фракціонування клітинних лізатів. Лізат лейкоцитів центрифугували 10 хв при 10 000 g. У результаті було отримано супернатант (C_1), який містив короткі філаменти та мономери актину та осад (O_1), який містив довгі актинові філаменти цитоскелету. 10 мкл супернатанту відбирали для SDS-ПААГ електрофорезу, решту піддавали високошвидкісному центрифугуванню (1 год, 100,000 g) для розділення мономерів актину, які переходили у супернатант (C_2) та коротких філаментів актину, які містилися в осаді (O_2).

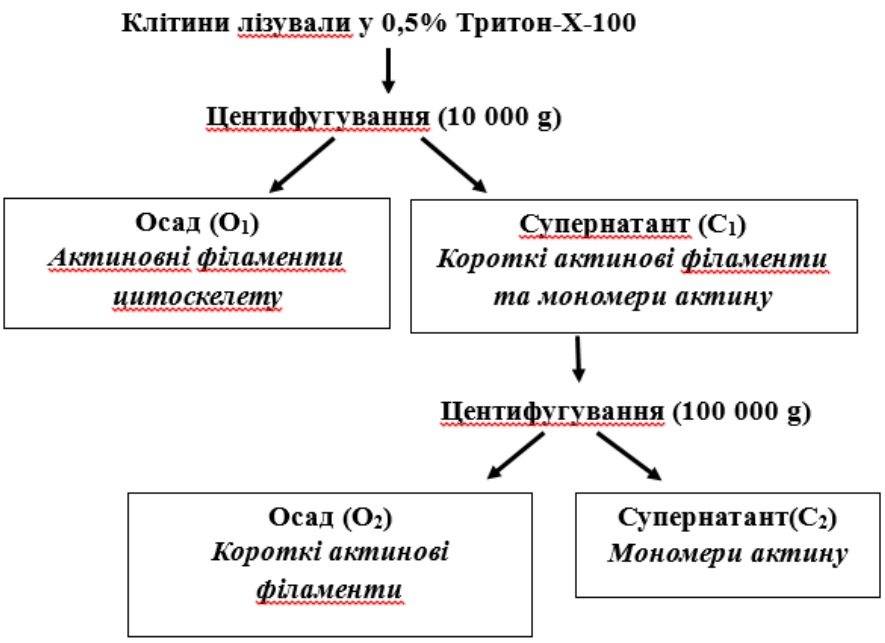

Рис. 2.1. Схема фракціонування клітинних лізатів, отриманих шляхом лізису клітин за допомогою 0,5% Тритон Х- 100 з метою розділення фракцій, що містять довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі філаменти та мономери актину

Відібрані осади (O_1 та O_2) та супернатанти (C_1 та C_2) прогрівали при 95°С протягом 5 хв у буфері Леммлі (62,5 мМ трис-HCl (pH 6,8), 1 мМ ЕДТА, 2% SDS, 5% β-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0,4% бромфеноловий синій).

2.24.3. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі [43, 87].

Осади (O_1 та O_2) та супернатанти (C_1 та C_2) піддавали SDS-ПААГ електрофорезу. Білки розділяли у блоках 15 %-го поліакриламідного гелю за наявності додецилсульфату натрію у буферній системі Лемлі.

Для приготування гелю використовували такі реактиви:

1. Розчин мономерів “АА”: 30% акриламід та 0,8% метиленбісакриламід; 2. Буфер “А” для розділяючого гелю: 0,375 М трис-HCl, pH 8,8;
3. Буфер “Б” для концентруючого гелю: 0,125 М трис-HCl, pH 6,8;
4. 10% персульфат амонію (APS).

5. 10% додецилсульфату натрію (SDS)

6. Буфер для електрофорезу (0,025 М трис-HCl, pH 8,3, 0,192 М гліцин, 0,1% SDS).

В установку для електрофорезу, у простір між двома скляними пластинами вносили 15%-вий розділяючий (3,28 мл H2O; 2,64 мл «АА»; 2 мл «А»; 0,8 мл SDS; 0,4 мл APS; 0,04 мл ТЕМЕД) та 5%-вий концентруючий (1,83 мл H2O; 0,39 мл «АА»; 0,75 мл «Б»; 0,3 мл SDS; 0,3 мл APS; 0,03 мл ТЕМЕД) гелі. В електрофоретичну установку заливали буфер для електрофорезу. Електрофорез проводили протягом 2,5 год при силі струму 15 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт на одну пластину. При переході проб з концентруючого гелю у розділяючий, силу струму збільшували до 25 мА на одну пластину.

2.24.4. Імоноблотинг білків

Після електрофоретичного розділення лізатів клітинних фракцій здійснювали перенесення білків з ПААГ під дією електричного поля на нітроцелюлозну мембрану [85, 86] з наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Перенесення проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА, в буфері, що містив 25 мМ трис-HCl (pH 8,3), 20% метанол та 192 мМ гліцин [24]. Вільні центри зв’язування на мембрані блокували протягом 12 год при 4°С 2% розчином BSA в ЗФР (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na_2HPO_4, 1,7 мМ KH_2PO_4, (pH 7,3)) з 0,05% твін-20. Згідно до поставленої мети мембрану інкубували з першими антитілами (Monoclonal Anti-Actin antibody produced in mouse, Sigma, США), розведеними у 10 000 раз у блокуючому буфері, протягом 1,5 год з наступним промиванням буфером для блокування (5 разів по 3 хв). Як другі антитіла використовували анти-мишачі антитіла, кон’юговані з пероксидазою хрону (Anti-Mouse Ig G (whole molecule) – peroxidase, Sigma, США), в розведенні у 1000 у блокуючому буфері. Інкубацію з другими антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали ЗФР/0,1% твін-20 (5

разів по 3 хв). Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору реактивів для посиленої хемілюмінесценції (Millipore, США). Час експонування мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав у середньому 5–15 хв. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз результатів вестерн-блотингу здійснювали з використанням програми GelPro 3.1.

Для контролю ідентичності вмісту білків у всіх пробах, мембрану відмивали від антитіл буфером для відмивки (забуферений фізіологічний розчин/0,1% твін-20) та, в подальшому, блокуючим буфером. Після цього її інкубували з першими анти-α-тубулін антитілами (Millipore, США), другими антитілами та проводили експозицію отриманих блотів на рентгенівську плівку.

2.25. Методи дослідження апоптозу лейкоцитів

2.25.1. Імуноцитохімічна детекція вмісту білків p53 і Bcl-2

Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних білків Bcl-2 та p53 використовували непрямий імунопероксидазний метод [172]. Лейкоцити, нанесені на предметне скло, фіксували у розчині метанолу при температурі –4^{0}С протягом 20 хв та 3–4 секунди в охолодженому ацетоні. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,1% тритоном Х-100 в ЗФР. Для блокування ендогенної клітинної пероксидази препарати інкубували в 0,3% розчині H_2O_2 (5 хв). Блокування вільних центрів зв’язування здійснювали з допомогою інкубування з 1% розчином БСА («Sigma-Aldrich», США) та негативним контролем (Negative control reagent, «DAKO», США) для блокування імуноглобулінподібних молекул. Для детекції білків p53 та Bcl-2 клітини інкубували з моноклональними антитілами до p53 (DAKO, США; клон DO-7, ізотип IgG_{2b}) та моноклональними антитілами до Bcl-2 (DAKO, США; клон 124, ізотип IgG_1) у ЗФР (1:25), що містив 1% БСА впродовж 2 год при 4°С. Зразки

відмивали у ЗФР з 0,05% тритоном Х-100 та інкубували з другими біотинільованими антитілами “LSAB®2 Biotinylated Link for Streptavidin HRP/AP” (DAKO, США) у ЗФР (1:10), що містить 1% БСА впродовж 1 год при кімнатній температурі. Інкубацію з антитілами проводили у вологій камері. Після відмивання у ЗФР, що містив 0,05% Тритон Х-100 та ЗФР, зразки інкубували впродовж 30 хв із авідин-біотин-пероксидазним комплексом “ExtrAvidin Peroxidase” («Sigma-Aldrich», США) у розведенні 1:125. Кольорову реакцію для детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3-амінобензидину “Liquid DABSubsstrateChromogen system” (DAKO, США).

Аналіз вмісту p53 та Bcl-2 у досліджуваних клітинах здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням ×40 акропланового об’єктиву мікроскопу MICROmed XS-5520 та відеокамери для мікроскопу (DCM310) з програмним забезпеченням (ScopePhoto). За інтенсивністю забарвлення досліджувані клітини були поділені на 3 групи: з негативною реакцією ($p53^{-}$ та $Bcl\text{-}2^{-}$), позитивною ($p53^{+}$ та $Bcl\text{-}2^{+}$) та різко позитивною ($p53^{++}$ та $Bcl\text{-}2^{++}$) реакцією. Негативними контролями специфічності зв’язування слугували клітини без використання як перших так і других антитіл. На препараті диференціювали 500 досліджуваних клітин за вищезазначеною схемою.

2.25.2. Флуоресцентний метод аналізу апоптозу за зв’язуванням анексину V [160]

У нормальних життєздатних клітинах фосфатидилсерин (ФС) локалізується у внутрішньому моношарі ліпідного бішару плазматичної мембрани клітини, а його транслокація у зовнішній моношар є ранньою ознакою апоптозу і зумовлює швидкий фагоцитоз апоптотичних клітин макрофагами [42]. Для виявлення експонування ФС на поверхні клітини використовували фосфоліпідзв’язуючий білок анексин V, кон’югований з флюорохромом – флуоресцеїнізотіоціанатом (Анексин V-FITC, довжина хвилі збудження FITC – 494 нм та емісії 518 нм). Оскільки при порушені цілісності мембрани, анексин зв’язується із ФС

внутрішнього ліпідного моношару, для реєстрації проникності клітинної мембрани використовували суправітальний барвник пропідій йодид (ПЙ). При проникненні в клітину, ПЙ зв'язується з молекулою ДНК та утворює сполуку, що флуоресціює у червоній області видимого діапазону (довжина хвилі збудження 536 нм та емісії 617 нм). Таким чином, метод подвійного флуоресцентного фарбування клітин Анексин V-FITC та ПЙ дає змогу оцінити кількість живих клітин, а також клітин на ранніх та пізніх стадіях апоптозу.

У роботі було використано набір реагентів Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, «BioVision» (США). Після відмивання у ЗФР $2 \cdot 10^5$ лейкоцитів ресуспендовували у 0,1 мл буферу (10 мМ HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 мМ NaCl і 2.5 мМ $CaCl_2$) та додавали 5 мкл Annexin V-FITC (робоча концентрація 2,5 мкг/мл) та 5 мкл PI (робоча концентрація 0,5 мкг/мл). Клітини інкубували 15 хв у темряві при кімнатній температурі, після чого до суспензії додавали ще 0,4 мл буферу. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson, США), використовуючи детектор FL1(для FITC) та FL2 (для ПЙ). На кожний варіант досліду підраховували не менше 10 000 клітин. Результати виражали у відсотках від загальної кількості клітини, застосовуючи наступну схему: Анексин V^-/ПЙ$^-$ – живі клітини, Анексин V^+ПЙ$^-$ – клітини з ранніми ознаками апоптозу; Анексин V^+/ПЙ$^+$ – клітини з пізніми ознаками апоптозу.

2.26. Оцінка проліферативної активності клітин кісткового мозку лімфоцитарно - гранулоцитарного ряду

Для дослідження проліферативної активності клітин лімфоцитарно-гранулоцитарного ряду було використано імуноферментний аналіз, що дає змогу кількісно оцінити рівень включення у проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину (BrdU). Піддослідним тваринам вводили BrdU фірми "Millipore" (США) з розрахунку 50 мкг/г маси тіла внутрішньочеревно. Через 12 годин після введення BrdU тварин декапітували, виділяли стегнові кістки для

подальшої аспірації кісткового мозку. Фракціонування суспензії клітин кісткового мозку здійснювали центрифугуванням у тришаровому градієнті густини фікол–тріомбрасту (Ficoll-400, “Pharmacia”, Швеція) [214]. Градієнт густини готували почерговим нашаруванням розчинів фікол–тріомбрасту у такому порядку: ρ_3 –1,11 г/см^3, ρ_2 – 1,09 г/см^3 та ρ_1 – 1,03 г/см^3 (по 0,5 мл кожного). Клітинну суспензію (0,1 мл) наносили верхнім шаром, після чого пробірки центрифугували 10 хв при 500 g. При цьому клітини концентруються 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. Проліферативну активність визначали згідно протоколу фірми-виробника набору “Brdu Cell Proliferation Assay” (“Millipore”, США).

2.26.1. Фарбування мазків кісткового мозку (комбіноване забарвлення Май- Грюнвальда-Романовського-Гимзи за Папенгеймом) [214]

На сухий мазок кісткового мозку піпеткою наносили 2 мл готового розчину фарби-фіксатора Май-Грюнвальда. Через 3 хв додавали однакову кількість дистильованої води і старанно перемішували фарбу на мазку. Коли мазок набував рожевого відтінку, барвник зливали і, не висушуючи його, дофарбовували свіжоприготовленим водним розчином фарби Романовського впродовж 8–15 хв. Потім фарбу зливали, а мазок промивали водопровідною водою.

Усі клітини кісткового мозку (не менше 500) у мазку підраховували у різних полях зору і обчислювали процентний вміст кожного виду клітин.

2.27. 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

3.1. Стабілізація безалкалоїдної фракції екстракту галеги лікарської за допомогою біогенних поверхнево-активних речовин, що синтезуються штамом бактерій *Pseudomonas sp.* PS-17

БФ ЕГЛ є в'язкою мазеподібною масою темно-зеленого кольору з приємним запахом, гіркуватою на присмак, добре розчинною в метиловому та етиловому спирті, нерозчинною в олії, у воді утворює темно-зелену суспензію, яка після струшування зберігає однорідність не менше 60 хв. Сухий залишок складає 26,17±0,05 %, а втрата в масі при висушуванні становить 5,09±0,03 % [224].

Згідно з методичними рекомендаціями ДФЦ МОЗ України при виборі доз для внутрішньошлункового введення, лімітуючим показником при визначенні гострої токсичності є максимальна доза четвертого класу токсичності (малотоксичні речовини) – 5 г /кг. Якщо при цьому не спостерігається загибелі тварин, введення більшої дози, як правило, є недоцільним [187, 224]. Зважаючи на це, для проведення дослідження токсичної дії БФ ЕГЛ була обрана доза 5 г/кг маси тіла тварини, яку вводили одноразово *per os* щурам масою 150-180 г (n=5). Як показали проведені дослідження, після перорального введення БФ ЕГЛ у дозі 5 г/кг ознак інтоксикації у щурів не виявлено, тварини були активними, реагували на світлові та звукові подразники, порушення дихання та судом не спостерігали. Споживання води та їжі у всіх дослідних щурів не відрізнялась від такого у групах інтактних тварин. Загибелі протягом всього періоду спостереження не зареєстровано.

Отже, проведені дослідження вказують на те, що $ЛД_{50}$ для БФ ЕГЛ знаходяться поза межами 5г/кг. Згідно з токсикологічною класифікацією, сполуки, які входять до складу БФ ЕГЛ при пероральному введенні належать до V класу токсичності – практично нешкідливі речовини [187, 224].

При розчиненні БФ ЕГЛ у воді утворюється суспензія, яка є нестабільною у часі, тому дотримуватися чіткого дозування такого екстракту практично неможливо. Будь-яка сировинна суміш із лікарських рослин має бути гідрофільною, стабільною, зберігати свою біологічну активність, мати прийнятний зовнішній вигляд і містити офіційно визнані безпечні наповнювачі [196]. Нестабільність і погана розчинність деяких сумішей створює труднощі у приготуванні препаратів, які мають виконувати роль харчового продукту з певною функцією (цукрознижувальною, антиоксидантною тощо). Одним із способів вирішення цієї проблеми є введення у рецептуру ПАР, що підсилює розчинність цієї лікарської сировини.

У сучасних лікарських засобах широко використовуються синтетичні ПАР, які, на жаль, можуть викликати алергічні реакції та підвищувати токсичність препаратів. На даний час у світі є тенденція до відмови від використання високотоксичних ПАР [153, 221]. Натомість постійно зростає комерційний інтерес до ефективних продуктів природного походження, до яких належать біоПАР [13, 132, 142]. У зв’язку з екологічною безпечністю і високою ефективністю, здатністю до емульгування, солюбілізації та міцелоутворення біоПАР мають великий потенціал до застосування у фармації [196].

Серед широкого спектру перспективних мікроорганізмів-продуцентів біо-ПАР привертають увагу представники роду *Pseudomonas,* які синтезують позаклітинні рамноліпіди з високою поверхневою, емульгувальною, піноутворювальною активністю. Штам *Pseudomonas sp. PS-17* здатний утилізувати широкий спектр органічних субстратів і синтезувати позаклітинні ПАР (речовини гліколіпідної природи, а саме рамноліпіди). У культуральній рідині рамноліпіди утворюють поверхнево-активний комплекс з біополімером – полісахаридом. Цей комплекс є екологічно безпечним, має високу поверхневу активність, легко виділяється і може використовуватися як цільовий промисловий продукт.

На даний час не існує подібних, стабілізованих за допомогою біоПАР, лікарських субстанцій, які б застосовувалися при лікуванні ЦД чи інших захворювань.

З метою забезпечення водорозчинності, збереження біологічної активності та підвищення терапевтичного впливу за рахунок ефективнішого засвоєння діючих речовин нами було проведено стабілізацію БФ ЕГЛ за допомогою біоПАР, які синтезуються штамом *Pseudomonas sp.* PS-17 (біокомплекс PS).

Біокомплекс PS є в'язкою речовиною світло-зеленого чи світло-коричневого кольору зі слабким специфічним запахом. Масова частка сухої речовини складає не менше 1,9%. Основними складниками біокомплексу PS є моно- і дирамноліпіди, біополімер – альгінат, жирні кислоти, рамноза та амінокислоти. Масова частка вільної рамнози у складі рамноліпідів біопрепарату становить не менше 0,5% [78].

Згідно з токсикологічним паспортом, середньосмертельна доза ($ЛД_{50}$) біокомплексу PS за умови внутрішньошлункового введення культуральної рідини для білих щурів і мишей становить більше 10 г/кг, отже, цей біокомплекс належить до речовин 4 класу небезпеки [218]. З огляду на це, застосовували концентрації (0,6–3,3 г/л) біокомплексу PS, які є нетоксичними для тварин і людини.

Для отримання стабільних емульсій БФ ЕГЛ нами було підібрано низку концентрацій біокомплексу PS. У вихідну суміш БФ ЕГЛ, яка є маслянистою субстанцією та налипає на стінки колби (рис. 3.1, А), додавали біокомплекс PS у концентраціях 0,6, 2,0 і 3,3 г/л і струшували на вортексі.

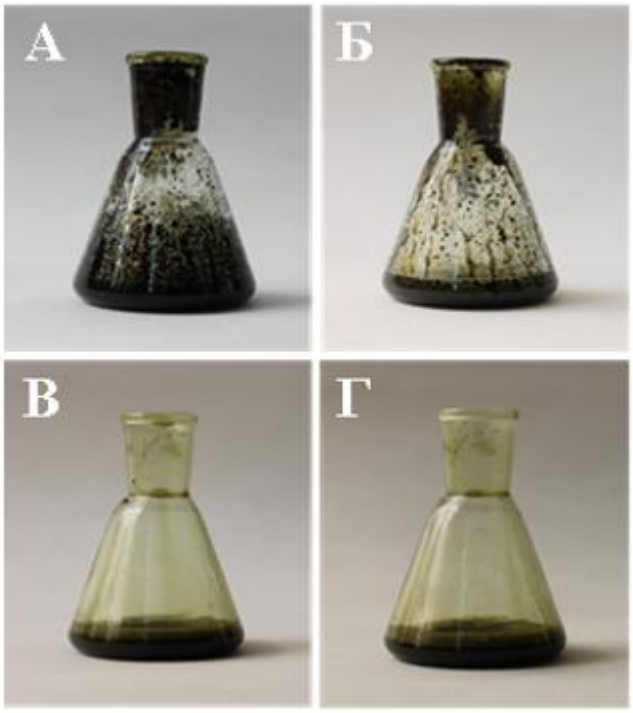

Рис. 3.1. Водна емульсія БФ ЕГЛ та її стабілізовані біокомплексом PS форми. Концентрація біокомплексу PS (г/л): А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л

Збільшення концентрації біоПАР сприяло утворенню стійкої емульсії, а стінки колби поступово очищалися (рис. 3.1, Б-Г). Ефективність емульгування зростала зі збільшенням концентрації біокомплексу PS до 3,3 г/л. Досліджено стабільність утворених емульсій упродовж тривалого часу. Встановлено, що додавання біокомплексу PS у всіх досліджених концентраціях до робочого водного розчину БФ ЕГЛ дає змогу отримати стійкі в часі емульсії типу “масло у воді”: отримані емульсії не розшаровувалися понад 10 діб.

Як видно з мікрофотографій (рис. 3.2), розмір частинок емульсії становив до 1 мкм.

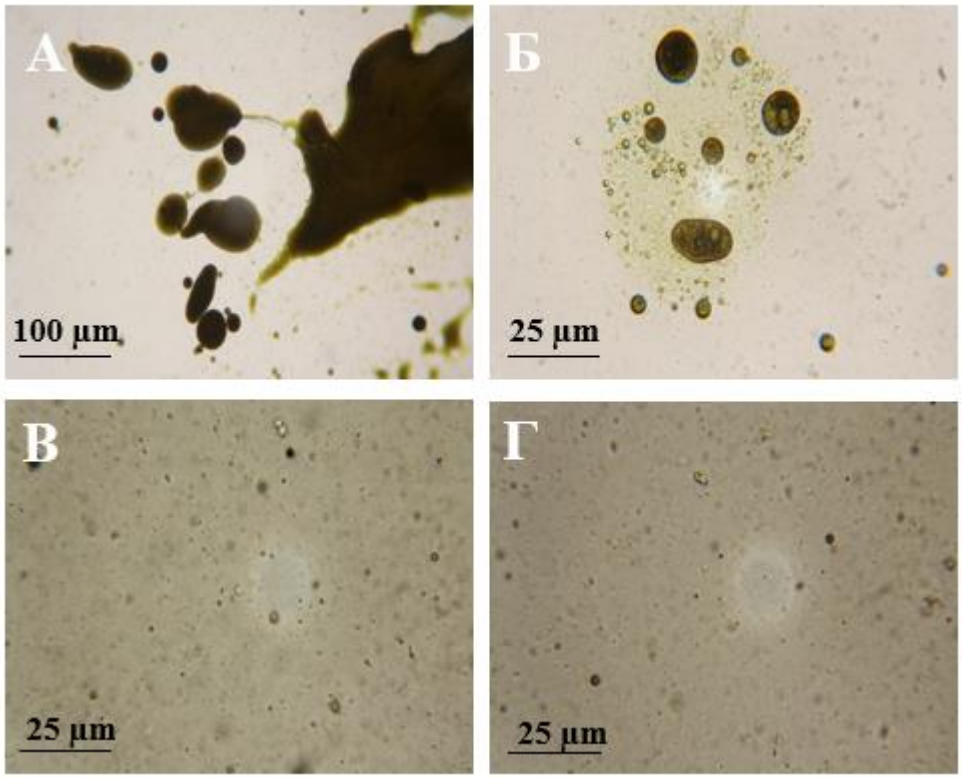

Рис. 3.2. Мікрофотографії емульсій БФ ЕГЛ та її стабілізованих біокомплексом PS форм. Концентрація біокомплексу PS (г/л): А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л

Частинки з таким розміром утворюють стійкі тонкі емульсії [16, 17]. Емульсію одержували внаслідок внесення біокомплексу PS до вихідної суміші, отриманої у разі додавання води до БФ ЕГЛ. Під час додавання біоПАР у концентрації 0,6 г/л отримана емульсія була неоднорідною: 30 % становлили краплі розміром до 1 мкм, 60 % – краплі розміром 5–10 мкм та 10% – краплі розміром більше 20 мкм (рис. 3.2, *Б*). Застосування біоПАР у концентрації 2,0 та 3,3 г/л (рис. 3.2, *В, Г*) дає змогу отримати дрібнодисперсні емульсії зі середнім розміром крапель менше 1 мкм, кількість яких становить до 80 %. Такі емульсії є стійкими і не розшаровувалися більше 30 діб.

Отже, встановлено, що додавання біоПАР у концентрації 3,3 г/л до вихідної суміші БФ ЕГЛ дозволяє отримати стійкі дрібнодисперсні емульсії. Такі емульсії

легше вводити через зонд піддослідним тваринам, що забезпечує чітке дотримання певного дозування діючих речовин.

3.2. Дослідження компонентного складу E^{ps}

В результаті аналізу компонентного складу E^{PS} методом газової хроматомасспектрометрії було ідентифіковано 27 сполук, а саме: вищі жирні кислоти та їх естери (63,90%), монотерпени (1,43%), дитерпени (5,60%), тритерпени (2,27%), фітостероли (17,30%), флавоноїди (2,98%) та вітамін Е (0,46%) (рис 3.3, табл. 3.1).

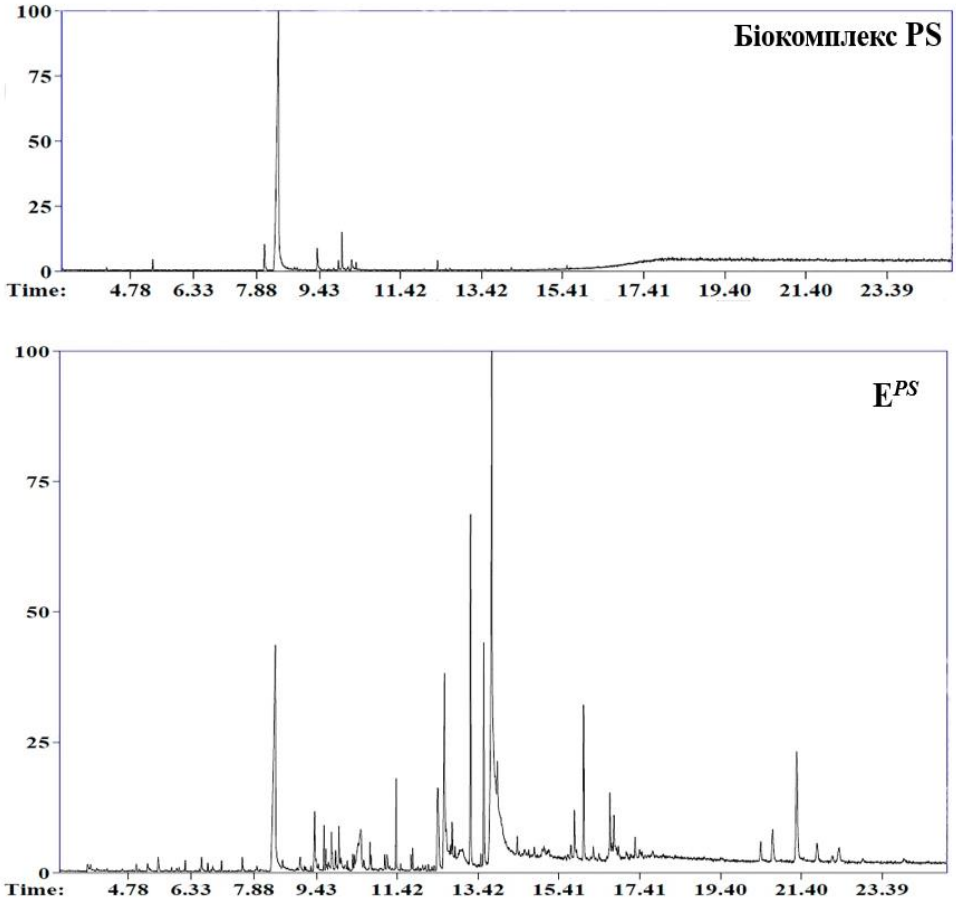

Рис. 3.3. Хроматограми компонентів біокомплексу PS та E^{ps}

Таблиця 3.1

Якісний склад та кількісний вміст біологічно активних речовин біокомплексу PS та E^{ps}

№	Час виходу, хв	Сполука	Вміст,%	
			біокомплекс PS	E^{ps}
1.	8,081	2-Деценова кислота, метиловий естер	3,794	10,456
2.	8,420	2-Деценова кислота	88,230	1,341
3.	9,612	2(4H)-Бензофуранон	-	0,628
4.	9,984	2-Додеценова кислота	4,309	0,359
5.	10,222	Інозитол	-	3,100
6.	10,638	Міристинова кислота	-	0,436
7.	10,750	4-Метиламінофенол	-	0,402
8.	11,215	Неофітадієн	-	1,010
9.	11,395	Лоліолід	-	1,339
10.	12,053	Пальмітинова кислота, етиловий естер	-	10,900
11.	12,232	Пальмітинова кислота, етиловий естер	-	2,969
12.	12,479	2 – метил- 1,2,3a,4,5 – гексагідропіроло – [1,2-a] хіназолін	-	2,894
13.	12.999	Фітол	-	3,675
14.	13.201	9,12,15-Ліноленова кислота, метиловий ефір	-	33,029
15.	13.332	9,12,15-Октадекатрієн-1-ол, (Z Z,Z)-	-	0,235
16.	15.235	Пальмітинова кислота, 2-гідрокси-1-(гідроксиметил) етиловий естер	-	1,611
17.	15.455	Фталева кислота, 2-етилгексил ізогексиловий естер	-	2,833
18.	16.085	2H-1-Бензопіран-7-ол, 3-(2,4- диметоксифеніл)-3,4-дигідро-	-	1,900
19.	16.287	6a,12a-Дигідро-6H-(1,3)діоксоло(5,6)бензофуро(3,2-c) хромен-3-ол	-	1,080
20.	16.816	Сквален	-	0,343
21.	18.499	Вітамін Е	-	0,46
22.	19.278	Кампестерол	-	1,966
23.	19.522	Стігмастерол	-	4,091
24.	20.015	Стігмастерол	-	10,634
25.	20.705	9,19-Циклоергост-24(28)-єн-3-ол, 4,14,-диметил-, (3.бета.,4.альфа.,5.альфа.) -	-	0,644
26.	20.824	α-Амірин	-	1,932
27.	22.197	Неофітадієн	-	0,920

Встановлено, що домінуючими компонентами досліджуваного екстракту є метиловий ефір ліноленової кислоти (33,029%) та пальмітинова кислота й етиловий естер пальмітинової кислоти (15,480 %). У складі стабілізованого екстракту за

допомогою біокомплексу PS виявлено 2-додеценову (4,309%), 2-деценову кислоти (88,230%) та метиловий естер 2-деценової кислоти (3,794%). Вміст цих компонентів у складі біокомплексу PS становив: 2-додеценової кислоти (4,309%), 2-деценової кислоти (88,230%) та метиловий естер 2-деценової кислоти (3,794%).

Також у складі екстракту виявлено міристинову кислоту (0,436%), 2-етилгексил ізогексиловий естер фталевої кислоти (2,833%)), спирт (Z,Z,Z)-9,12,15-октадекатрієн-1-ол (0,235%), інозитол (3,100%) та похідну сполуку хіназоліну (2 – метил- 1,2,3a,4,5 – гексагідропіроло – [1,2-a] хіназолін (2,894%)). Після коми або скрізь соті, або тисячні.

Хроматомасспектрометричне дослідження дало змогу ідентифікувати у складі досліджуваного екстакту флавоноїди: 3-(2,4- диметоксифеніл)-3,4-дигідро-2H-1-бензопіран-7-ол (1,900%) та 6a,12a-дигідро-6H-(1,3)діоксоло(5,6)бензофуро(3,2-c)хромен-3-ол (1,080%)) та фітостероли: зокрема кампестерол (1,966%), стігмастерол (14,725%) та 4,14,-диметил-, (3.β,4.α,5.α.)-9,19-циклоергост-24(28)-єн-3-ол (0,644%)) (рис. 3.3, табл. 3.1).

У досліджуваній субстанції було виявлено низку терпенів: монотерпен лоліолід (1,339%), дитерпени: неофітадієн (1,93%) і фітол (3,675%)) та тритерпени: сквален (0,343) і α-амірин (1,932%)) (табл. 3.1., рис. 3.3).

Таким чином, газовий хроматомасспектрометричний аналіз компонентного складу E^{ps} дав змогу ідентифікувати низку біологічно активних речовин з потенційною цукрознижуючою (фітол, етиловий естер пальмітинової кислоти, фітостероли –кампестерол і стігмастерол та похідні хіназоліну) [124, 135, 195] та з антиоксидатною (фітол, флавоноїди та вітамін Е) діями [40, 89, 186].

3.3. Дослідження цукрознижувальної дії E^{ps} за умов експериментального цукрового діабету

Оскільки порушення метаболізму глюкози, що призводить до її надлишку у крові є свідченням розвитку ЦД і «запускає» каскад патологічних процесів, доцільно було оцінити ефективність цукрознижувальної дії E^{ps} у нормі та при діабеті.

Аналіз отриманих результатів показав, що при введенні E^{ps} контрольним тваринам вміст глюкози у крові практично не змінювався. Водночас встановлено виражену гіпоглікемічну дію E^{ps} за умов ЕЦД – концентрація глюкози знижувалася на 37%, порівняно з діабетом і досягала фізіологічних значень (рис. 3.4).

Вимірювання глюкози у крові оцінює поточну (теперішню) концентрацію глюкози, яка може залежати від багатьох чинників (прийому та складу їжі, фізичних навантажень і їх інтенсивності, емоційного стану хворого і навіть часу доби). Очевидна висока ймовірність того, що визначення поточної концентрації глюкози у крові не буде відображати дійсний ступінь компенсації ЦД, а це може призвести або до передозування лікарських препаратів, або до невиправданого зменшення їхньої кількості. Тому на сьогодні вважається, що ключовим показником ступеня компенсації вуглеводного обміну і, відповідно, якості лікування та ризику розвитку віддалених ускладнень цукрового діабету є рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) [15, 73].

Цінність визначення HbA1c в тому, що він характеризує середню концентрацію глюкози у крові протягом тривалого проміжку часу, тобто справжній ступінь компенсації ЦД протягом останніх 1–2 місяців. Рівень HbA1c свідчить одночасно про концентрацію глюкози натще, про допрандіальний і постпрандіальний її рівень. На тлі гіперглікемії, яка розвивається у щурів за умов ЕЦД, виявлено підвищення глікозилювання гемоглобіну, що на 66% перевищує контрольні значення (рис. 3.4.).

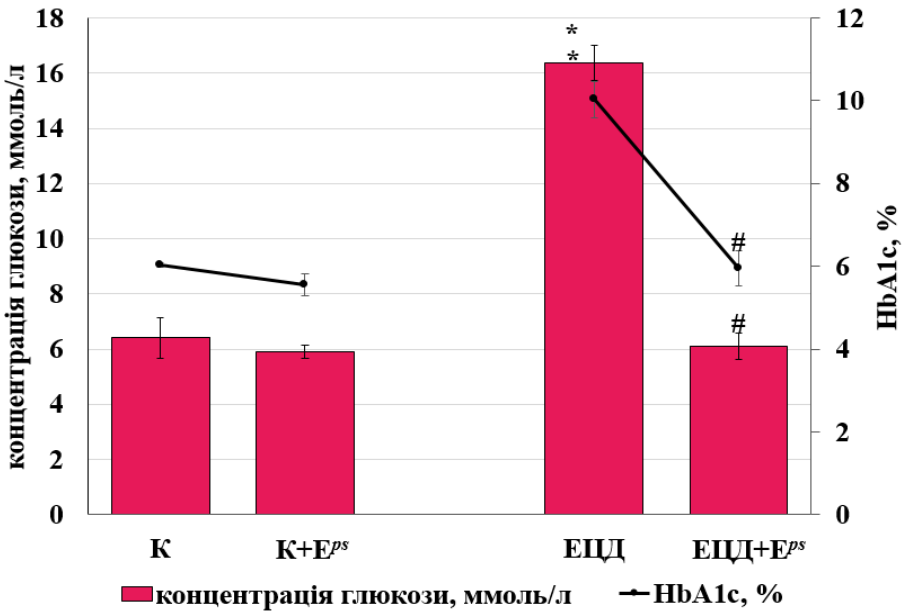

Рис. 3.4. Вплив E^{ps} на вміст глюкози та глікозильованого гемоглобіну у нормі та за умов ЕЦД (M±m, n = 5-10)

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

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

Було з'ясовано, що за умов застосування E^{ps} відбувається зниження вмісту HbA1c у тварин із досліджуваною патологією на 41%, водночас нами не виявлено змін цього показника у тварин контрольної групи. Зниження рівня HbA1c свідчить про кращий рівень скомпенсованості діабету, що, зменшує ризик розвитку таких ускладнень діабету, як ретинопатія, нефропатія, ушкодження периферичних нервів та судин [159].

В останні роки доведено, що не лише препрандіальна, але і постпрандіальна глікемія несприятливо впливає на розвиток судинних ускладнень діабету [117]. Звідси виникла необхідність використовувати ГТТ не тільки для діагностики діабету, але і як стандартизований тест для оцінки ефективності лікування, спрямованого на зниження постпрандіальної гіперглікемії.

Антигіперглікемічну дію E^{ps} оцінювали за здатністю знижувати рівень глюкози на максимумі розвитку гіперглікемії після навантаження глюкозою. Як критерій сумарної відповіді на стандартний глюкозотолерантний тест розраховували

AUCglu, який відображає загальне підвищення концентрації глюкози після введення цього моносахариду та досліджуваного екстракту.

На рис. 3.5 представлено глікемічні криві толерантності до глюкози у разі введення E^{ps} контрольним тваринам і щурам зі стрептозотоциніндукованим діабетом упродовж 14 днів. Аналіз результатів глікемічних кривих показав максимальне підвищення концентрації глюкози у крові контрольних тварин (у три рази щодо початкового рівня) на 20-ту хвилину після введення глюкози *per os* у дозі 1 г/кг (рис. 3.5).

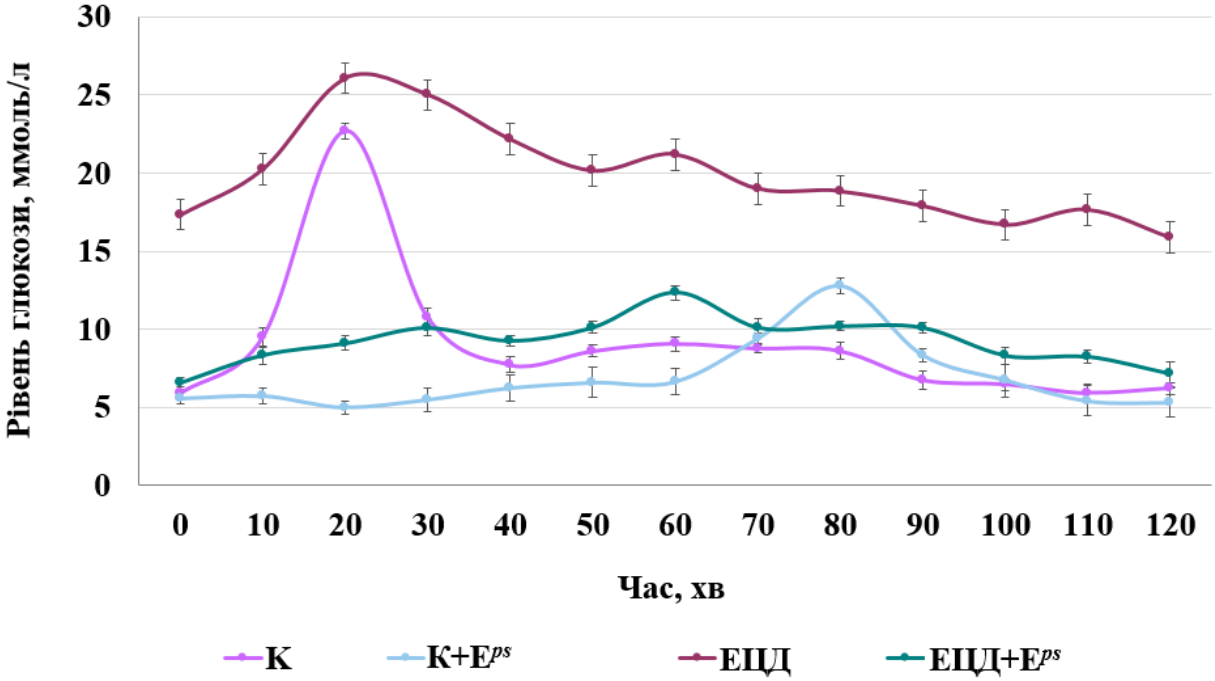

Рис. 3.5. Концентрація глюкози у крові тварин після цукрового навантаження у нормі, за ЕЦД та на фоні введення E^{ps} (M ± m, n = 6–8)

У цій групі тварин рівень глюкози нормалізувався через 90 хв з моменту глюкозного навантаження. У разі чотирнадцятиденного введення E^{ps} контрольним тваринам відмічено зсув піку концентрації глюкози з 20-ї на 80-у хвилину проведення ГТТ, і підвищення значень цього показника у 1,4 рази щодо початкового рівня. При введенні E^{PS} тваринам хворим на цукровий діабет, глікемічний пік

зафіксовано на 60-у хвилину експерименту (концентрація глюкози зростала у 1,9 рази щодо початкового рівня).

Застосування досліджуваного екстракту сприяло вірогідному підвищенню толерантності до глюкози. Це зумовило значуще зменшення інтегрального показника глікемії – площі під кривою глюкози у контрольних та хворих на діабет тварин на 25% і 47% відповідно (рис 3.6).

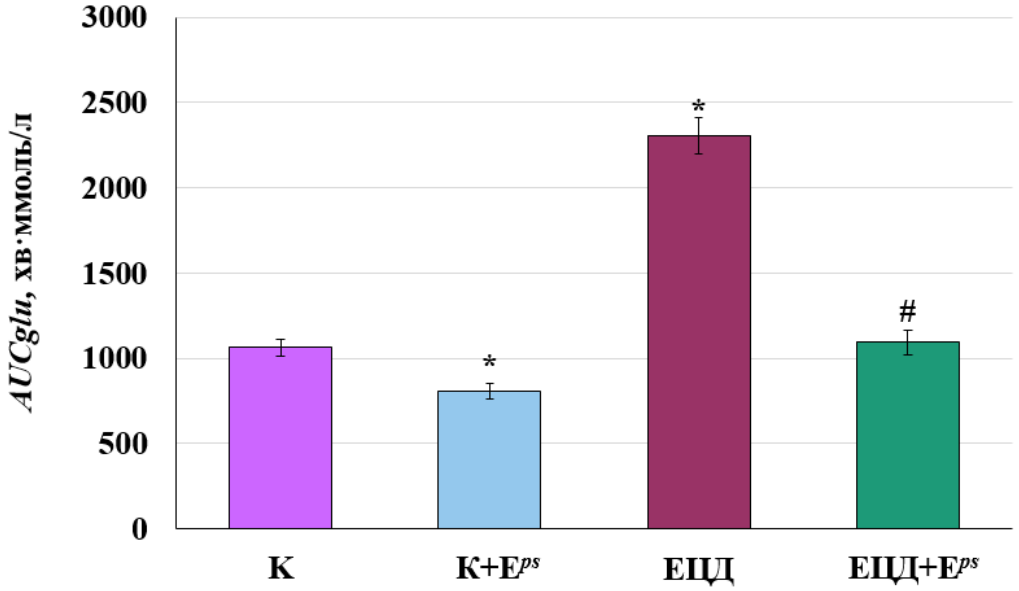

Рис. 3.6. Вплив E^{ps} на площу під глікемічними кривими після глюкозного навантаження у нормі та за умов ЕЦД (M±m, n = 4–8)

Після харчової глікемії на фоні введення E^{ps} зниження рівня цукру в крові свідчить про підвищення толерантності до глюкози у зв’язку із повільнішим її всмоктуванням у шлунково-кишковому тракті, що веде до більш рівномірного навантаження на інсулярний апарат протягом усього процесу травлення.

Отже, введення E^{ps} тваринам з ЕЦД призводило до зниження концентрації глюкози та глікозильованого гемоглобіну до фізіологічних значень і проявляло позитивний вплив на динаміку засвоєння глюкози. На основі газохроматографічного визначення компонентного складу досліджуваного екстракту можна припустити, що ефективна цукрознижувальна дія може бути зумовлена наявністю у його складі фітолу [48], естерів пальмітинової кислоти [135], α-амірину [134], похідних хіназоліну [151, 208] або їхньою синергічною дією.

Швидкість зниження рівня глюкози після її перорального введення залежить головним чином від функції β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, основними показниками стану яких є концентрація інсуліну та С-пептиду.

Встановлено вірогідне зниження вмісту С-пептиду (у 2,15 рази) та інсуліну (у 1,7 рази) у плазмі крові тварин з ЕЦД, порівняно з контролем (рис. 3.7). Отримані результати свідчать про ураження β-клітин острівців Лангерганса за умов стрептозотоцинового діабету.

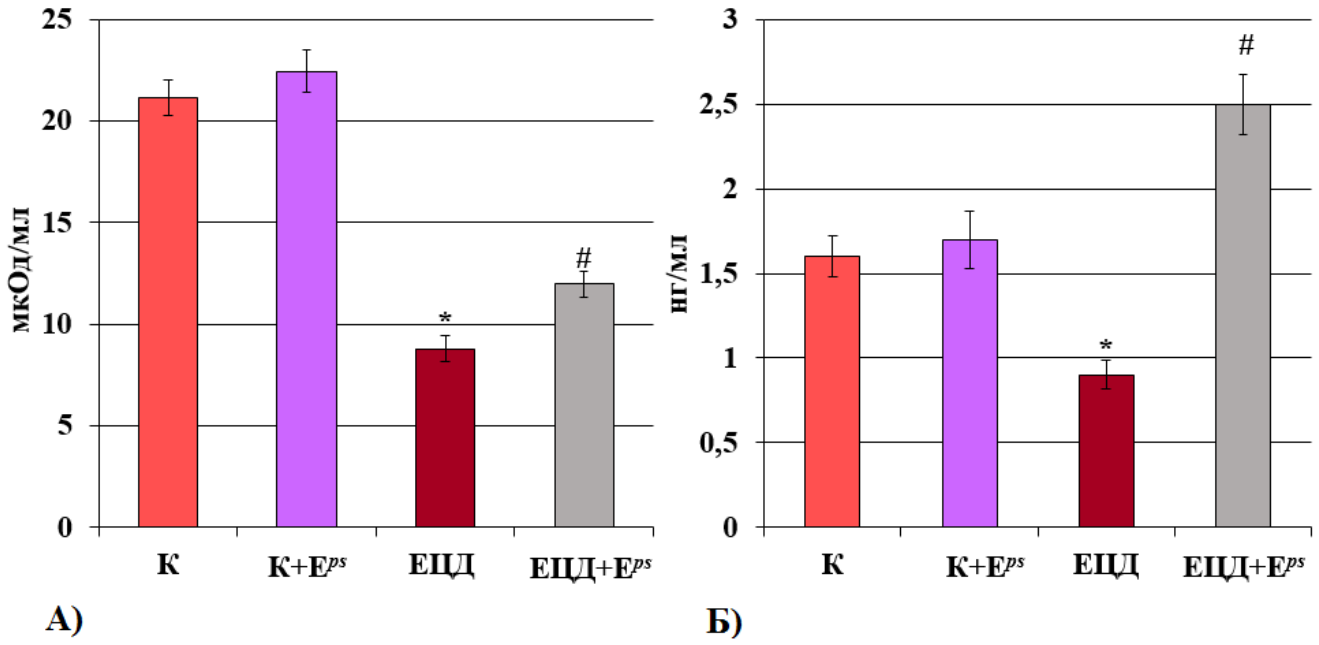

Рис. 3.7. Концентрація інсуліну (А) та С-пептиду (Б) у плазмі крові тварин у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення E^{ps} (M ± m, n = 5–6)

Після курсу введення E^{ps} концентрація С-пептиду та інсуліну в тварин з ЕЦД підвищувалась (у 2,18 та 1,7 рази) щодо діабету (рис. 3.7). Інсулін і С-пептид секретуються у кров в еквімолярних кількостях. Час піврозпаду С-пептиду в крові вищий, ніж для інсуліну, тому рівень С-пептиду є стабільнішим індикатором секреції інсуліну, ніж швидкозмінний рівень самого гормону.

З метою обґрунтування механізмів цукрознижувальної дії досліджуваного екстракту було проведено гістологічне дослідження клітин підшлункової залози за умов діабету.

При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози тварин контрольної групи і тварин, яким вводили E^{ps} відмічено збереження правильної структури часточок підшлункової залози. Острівці Лангерганса здебільшого средніх та крупних розмірів, добре виражені, оточені тонким прошарком сполучної тканини (рис. 3.8. А, Б, 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.

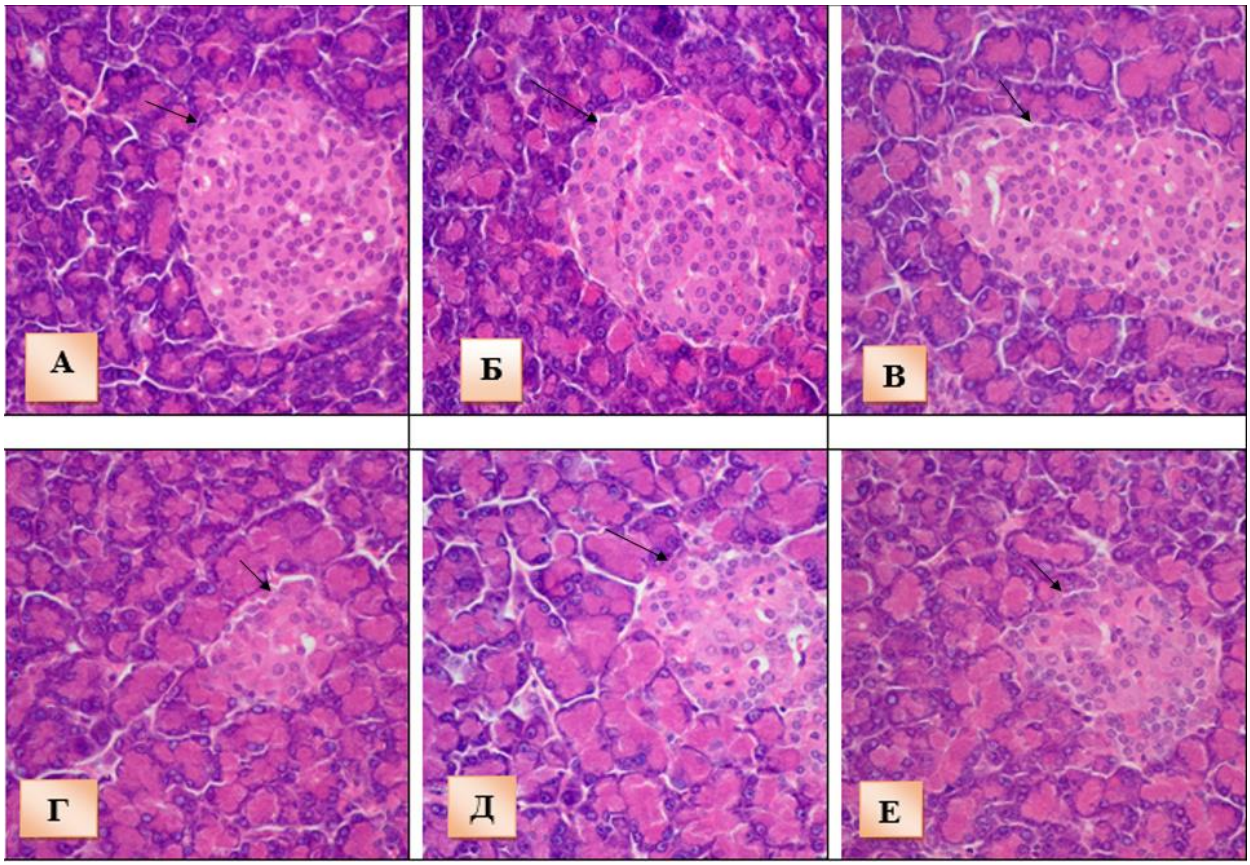

Рис. 3.8. Морфологічна структура підшлункової залози

(→) – Острівці Лангерганса підшлункової залози

А – контроль, Б – контроль + E^{ps} (0,6 г/кг), В – E^{ps} (1,2 г/кг) – велика кількість клітин у панкреатичних острівцях; Г – ЕЦД – дрібний острівець Лангерганса з

ознаками дискомлектації секреторних клітин з вакуолізацією цитоплазми; Д – ЕЦД + E^{ps} (0,6 г/кг) – дистрофічні зміни острівця Лангерганса; Е – ЕЦД + E^{ps} (1,2 г/кг) – збільшення кількості секреторних клітин, зниження ступеня дистрофії. Фарбування гематоксилін – еозином. Збільшення 40х10.

Після введення токсичної дози стрептозотоцину спостерігалось ураження інкреторного апарату підшлункової залози. Відмічено нерівномірне розміщення острівців Лангерганса, а в окремих часточках повну їхню відсутність (рис. 3.8. Г). В результаті морфометричних досліджень встановлено, що кількість панкреатичних острівців на стандартній одиниці площі зменшилась більш ніж в 3 рази порівняно з показниками контрольної групи (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Результати морфометричного дослідження підшлункової залози у щурів зі стрептозотоциновим діабетом на фоні введення (M±m, n=4)

Парамет-ри	Кількість острівців на стандартній площі зрізу (N/10мм^2)	Площа острівців (мкм^2)	Діаметр острівців (мкм)	Об'єм острівців (мкм^3)	Кількість β – клітин /1000мкм^2
К	15,91±0,955	10440±358,5	160,7±3,814	$2,20x10^6$±$1,52x10^5$	7,79±0,280
К+E^{ps} (0,6 г/кг)	14,94±0,945	9785±523,7	152,6±5,658	$1,92x10^6$±$2,29x10^5$	7,18±0,192
К+E^{ps} (1,2 г/кг)	15,65±0,595	10900±388,2	161,9±5,548	$2,28x10^6$±$2,38x10^5$	8,09±0,308
ЕЦД	4,420±0,743*	4620±497,0*	106,5±4,669*	$6,58x10^5$±$8,88x10^{4*}$	4,74±0,174*
ЕЦД+E^{ps} (0,6 г/кг)	5,673±0,631*	5354±387,4*	113,7±3,752*	$7,88x10^5$±$7,40x10^{4*}$	5,12±0,325*
ЕЦД+E^{ps} (1,2 г/кг)	6,640±0,605*#	6623±331,2*#	119,7±4,663*	$9,28x10^5$±$11,37x10^{4*}$	5,62±0,145*#

Також відмічено зміни індивідуальних параметрів острівців підшлункової залози: площі, діаметру, обсягу (табл. 3.2). У секреторних клітинах острівців

Лангерганса виявлено дегенеративні процеси: вакуолізація цитоплазми, вогнища некрозу, деформація ядер, нечіткість меж клітин (рис. 3.8. Г). Кількість β–клітин і їх секреторних гранул різко знижувалася, про що свідчить слабка інтенсивність забарвлення альдегід-фуксином. У непошкоджених клітин, які розташовувалися поодинці або у вигляді дрібних скупчень, виявлено гіпертрофію ядер. Запальні зміни були представлені нерівномірним набряком строми, повнокров'ям кровоносних судин і лімфоцитарною інфільтрацією по периферії острівців. Зазначалося потовщення судин і міжчасточкової сполучної тканини підшлункової залози.

При введення тваринам з ЕЦД E^{ps} в 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. 3.8, Д). Натомість, E^{ps} в дозі 1,2 г/кг маси тіла виявляє більш виражену цитопротекторну дію на клітини підшлункової залози за умов ЕЦД, про що свідчить статистично достовірне збільшення показника щільності розташування острівців Лангерганса, їх індивідуальних показників, кількості інкреторних клітин. Виявлено відносно збережені β-клітини з ознаками незначної вакуолізації цитоплазми і зниженням ступеня дегрануляції (рис. 3.8, Е), однак відмічено збереження ознак периваскулярного склерозу і запалення.

Таким чином, доведено виражену цукрознижуючу дію E^{ps} у дозі 0,6 г/кг за умов ЕЦД, 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. Застосування E^{ps} у дозі 1,2 г / кг виявляє цитопротекторний вплив на інкреторний апарат підшлункової залози.

Одержані результати щодо коригуючого впливу досліджуваного екстрату на структурно-функціональний стан β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози підтверджують доцільність його застосування для запобігання розвитку цукрового діабету шляхом залучення різних біохімічних механізмів, в яких біологічно активні компоненти екстракту беруть пряму або опосередковану участь.

3.4. Вплив E^{ps} на прояви оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету

Згідно сучасних уявлень ключова роль у розвитку діабетичних ускладнень належить гіперглікемії, яка реалізує свій негативний вплив через механізми активації утворення АФО, неферментативного глікозилювання і тканинну гіпоксію. Це положення в останні роки визначило терапевтичний підхід, який передбачає жорсткий контроль рівня глюкози крові. Однак труднощі у досягненні нормоглікемії, а також неухильна прогресія захворювання незважаючи на ранню і активну цукрознижуючу терапію у пацієнтів із ЦД 1 типу вимагає додаткового використання лікарських засобів, зокрема антиоксидантів, які завдяки здатності регулювати процеси вільно радикального окиснення в клітинах можуть вважатися засобами патогенетичної терапії [173].

Розвиток експериментального цукрового діабету супроводжувався значним підвищенням базального рівня продукції АФО у лейкоцитах щурів, що у 3,7 разів перевищує контрольні значення (рис. 3.9, А-Б). У забезпеченні окисно-відновної рівноваги крові важливу роль відіграють поліморфноядерні лейкоцити, які здатні генерувати АФО. Згідно з даними літератури лейкоцити мають три ферментативні системи генерації АФО: мембранозв’язану НАДФН-оксидазу, пероксидази – мієлопероксидазу у нейтрофілах та еозинофільну пероксидазу в еозинофілах, а також NO-синтазу [186]. Активність цих ферментних систем та порушення функціонування компонентів антиоксидантної системи призводить до збільшення рівня АФО у лейкоцитах.

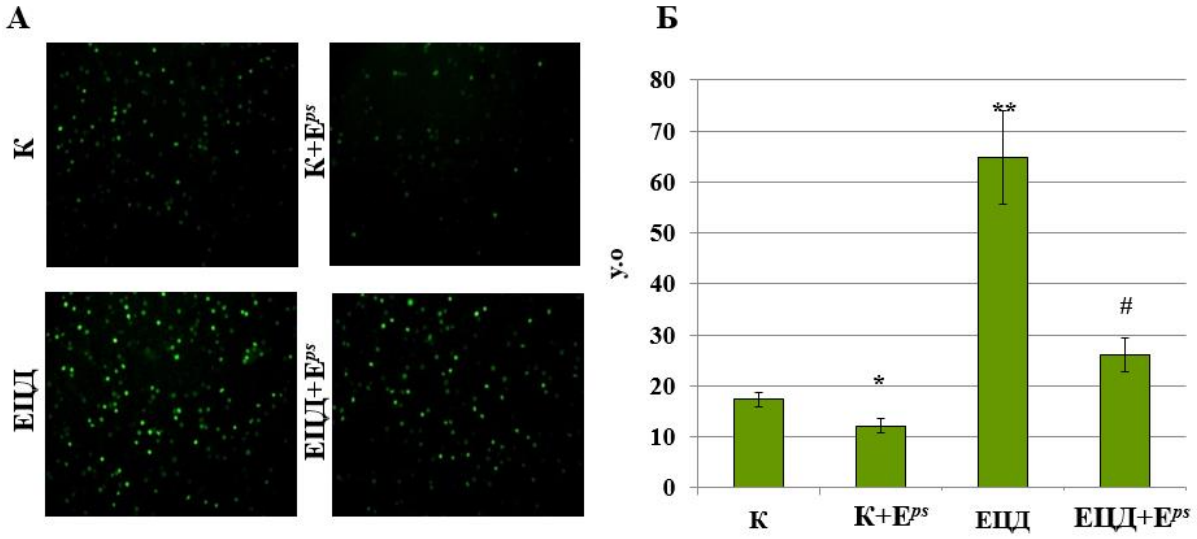

Рис. 3.9. А – Мікрофотографії лейкоцитів периферичної крові щурів (х 40);

Б – Оцифровані дані мікрофотографій, що відображають рівень генерації АФО у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флуоресценції 2′,7′-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату

У разі введення E^{ps} 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. 3.9, А-Б).

Як видно з отриманих результатів (табл. 3.3.) за ЕЦД у лейкоцитах щурів збільшується активність NO-синтази в 1,6 рази порівняно з контролем. При цукровому діабеті 1 типу внаслідок активації прозапальними цитокінами (ФНП-α, ІЛ-1, ІЛ-6 та ін.) у багатьох типах клітин, зокрема в лейкоцитах, відбувається експресія гену індуцибельної NO-синтази та надмірне утворення NO. Водночас зростає вміст стабільних окиснених форм NO – нітрит- та нітрат-аніонів у 1,6 та 3,8 рази відповідно. Слід зауважити, що нітрит-аніон може легко відновлюватися до NO.

Зростання активності NO-синтази та вмісту NO_2^- у лейкоцитах крові за ЦД 1-го типу вказують на функціональну субактивованість досліджуваних клітин. За таких умов у нейтрофільних гранулоцитах і макрофагах активується кисневозалежний

метаболізм, що призводить до окиснення NO в пероксинітрит, нітрити й нітрати [206].

Збільшення активності NO-синтази та вмісту стабільних метаболітів NO може призвести до посилення вільнорадикальних процесів, оскільки взаємодія між NO та $\bullet O_2^-$ призводить до утворення в лейкоцитах високотоксичного пероксинітриту ($ONOO^-$), що здатен модифікувати біологічні структури завдяки їх окиснення або нітрозування.

Таблиця 3.3.

Вплив E^{ps} на активність NO-синтази та вміст нітрит- та нітрат-аніонів в лейкоцитах щурів у нормі та за умов ЕЦД (M ± 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#

При стрептозотоциновому діабеті на фоні введення E^{ps} тваринам із ЕЦД відмічено незначне зниження активності NO-синтази та вмісту нітрит- й нітрат-аніонів порівняно з діабетом (табл. 3.3). У разі введення E^{ps} тваринам контрольної групи було виявлено незначне зростання активності NO-синтази та вмісту стабільних метаболітів нітроген (II) оксиду (табл. 3.3).

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

Внаслідок зростання вмісту АФО та АФН в клітині відбувається інтенсифікація вільнорадикального окиснення біосубстратів. Модифікацію білкових молекул за дії АФО досліджували за утворенням додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах

амінокислот, що є стабільним показникам розвитку оксидативно-нітративного стресу [184, 186].

При ЕЦД встановлено зростання вмісту ОМБ нейтрального та основного характеру в лейкоцитах периферичної крові щурів (у 2,3 та 3,4 рази відповідно) (рис. 3.11). Під час ОМБ відбувається зміна їх характеристик, таких як гідрофобність, ізоелектрична точка, термостабільність, підвищується чутливість білків до протеолізу та спостерігається зниження ензиматичної активності. Карбонільні інтермедіати (гліоксал, метилгліоксал та 3-деоксиглюкозон) здійснюють окисне глікозилювання білків, утворюючи кінцеві продукти неензиматичного глікозилювання, які можуть слугувати джерелом АФО [50].

При введенні E^{ps} тваринам з досліджуваною патологією знижувався вміст продуктів ОМБ нейтрального характеру в лейкоцитах крові на 31,9 % та основного характеру на 48,4 %. У групі здорових тварин антиоксидантна дія досліджуваного екстракту виражена у меншій мірі, ніж за умов ЕЦД (рис. 3.10).

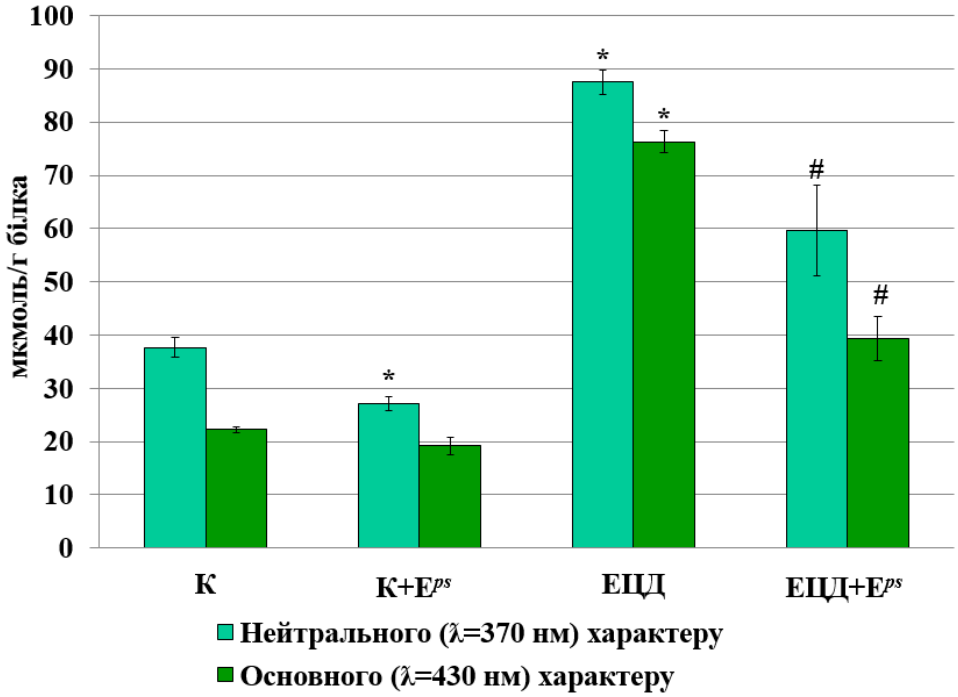

Рис. 3.10. Вміст продуктів окисної модифікації білків у лейкоцитах крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні E^{ps}

Також, встановлено зростання вмісту ТБК-ПП у лейкоцитах периферичної щурів з ЕЦД у 2,6 рази порівняно з контролем (рис. 3.11). Продукти ПОЛ є сильними окиснювачами і можуть посилювати процеси ОМБ [184].

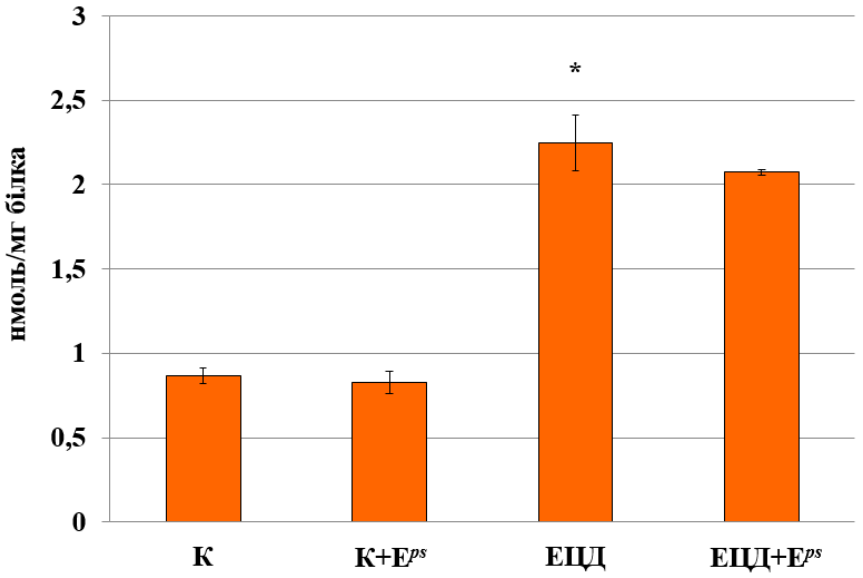

Рис. 3.11. Вміст ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні E^{ps}

ПОЛ відбувається переважно у мембранах, що призводить до потовщення або деструкції ліпідного бішару, зменшення площі білок-ліпідних контактів, порушення функціональної активності білків та ензимів, зміни проникності мембрани та поверхневого заряду, а також порушення функціонального стану мембрано-рецепторного комплексу. Накопичення продуктів вільнорадикального окиснення призводить до змін фізико-хімічних характеристик мембран клітин крові, що спричиняє зміну реологічних властивостей цієї біологічної рідини [202].

Дія E^{ps} спрямована на зниження інтенсивності накопичення продуктів ПОЛ у лейкоцитах тварин контрольної групи та хворих на цукровий діабет, проте її вплив на ці процеси виражений у меншій мірі, ніж на ОМБ.

Негативній дії АФО в організмі протистоїть АОС, функціонування якої спрямовано на нейтралізацію вільних радикалів, а також на репарацію спричинених ними ушкоджень [186, 225].

Недостатність синтезу інсуліну при цукровому діабеті 1 типу може бути причиною змін антиоксидантного статусу організму. На експериментальних моделях стрептозотоцин- та аллоксан-індукованого діабету щурів було показано зниження активності Cu-Zn-СОД в печінці, нирках, еритроцитах і перитонеальних макрофагах та каталази в аорті та перитонеальних макрофагах [7].

Аналіз отриманих результатів свідчить про неспроможність антиоксидантної системи клітин крові реалізувати в повному обсязі захисно-адаптаційні механізми за умов оксидативного стресу. Активність СОД, каталази та ГПО знижувалася у лейкоцитах периферичної крові щурів при стрептозотоциновому діабеті (табл. 3.4). Причиною інактивації ферментів за даної патології може бути глікозилювання ензимів. Глюкоза зв'язується з аміногрупами кінцевих амінокислот або ε-аміногрупами лізину.

Таблиця 3.4

Активність окремих ферментів АОС у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні E^{ps} (M ± 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} щурам контрольної групи призводило до підвищення активності каталази (на 19,5 %) та ГПО (на 32,5 %) у лейкоцитах порівняно з інтактними тваринами. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення екстракту відмічено вірогідне зростання активності СОД (на 47,1 %) і каталази (на 23,4 %), що узгоджується з результатами пригнічуючої дії цього екстракту на процеси утворення АФО та окислювальної модифікації білків і ліпідів.

Таким чином, E^{ps} у дозі 0,6 г/кг здійснює протекторну дію щодо ключових компонентів системи антиоксидантного захисту організму за ЕЦД. Підвищення активності ензимів АОС у разі введення E^{ps} тваринам з ЕЦД узгоджується з результатами пригнічуючої дії цього екстракту на процеси утворення АФО, АФН, окислювальної модифікації білків і ліпідів. Протекторний ефект E^{ps} на лейкоцити периферичної крові щурів при ЦД ми пояснюємо здатністю компонентів, які входять до його складу регулювати прооксидантно–антиоксидантну рівновагу шляхом скавенджерування вільних радикалів та запобігання інгібування ключових компонентів ензиматичної ланки АОС. Встановлений біологічний ефект можна пояснити наявністю в складі екстракту біологічно активних речовин з антиоксидантними властивостями (фітолу, флавоноїдів та вітаміну Е).

3.5. Вплив E^{ps} на процес апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД

Сучасні дослідження вказують на те, що оксид азоту може виявляти генотоксичний вплив, пошкоджуючи хімічну структуру ДНК. Крім того, NO активує низку ферментів (наприклад полі-(АДФ-рибозо)-полімеразу), які утворюють численні розриви в ДНК [174]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів.

Ключову роль у запуску програми апоптозу відіграє співідношення індукторів та репресорів даного процесу у клітині. Особливу увагу у цьому відношенні приділяють білкам - регуляторам апоптозу – Bcl-2 та p53 [46, 47]. При дослідженні у лейкоцитах вмісту проапоптотичного білка p53 показано, що за умов ЕЦД підвищується кількість клітин із позитивною реакцією ($p53^{+}$) на наявність цього білка порівняно з контролем (на 26%). Водночас виявлено зниження кількості клітин із негативною реакцією ($p53^{-}$) та клітин з різко позитивною реакцією ($p53^{++}$) на вміст білка p53, порівняно з контролем (рис. 3.12, рис. 3.13).

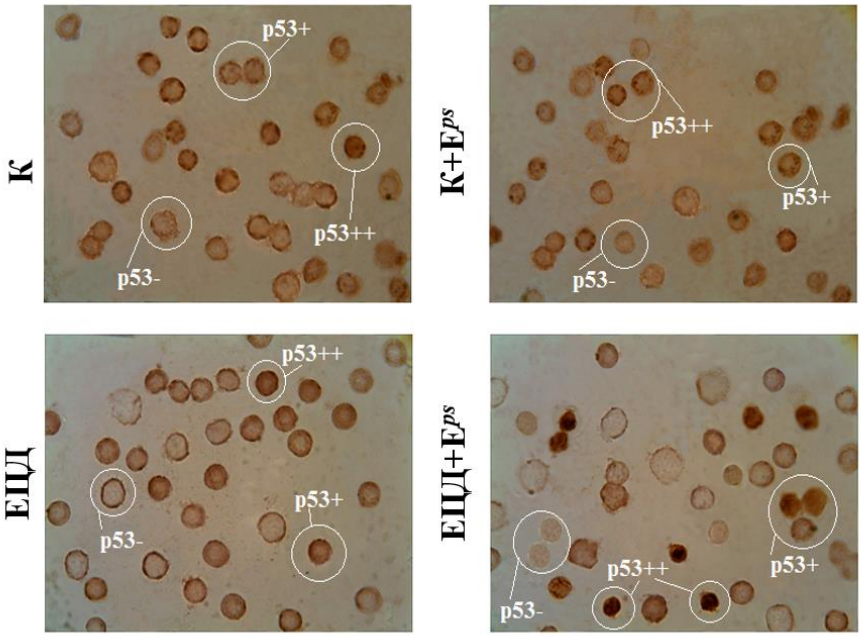

Рис. 3.12. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до білка p53 за умов введення E^{ps} контрольним тваринам та щурам з ЕЦД

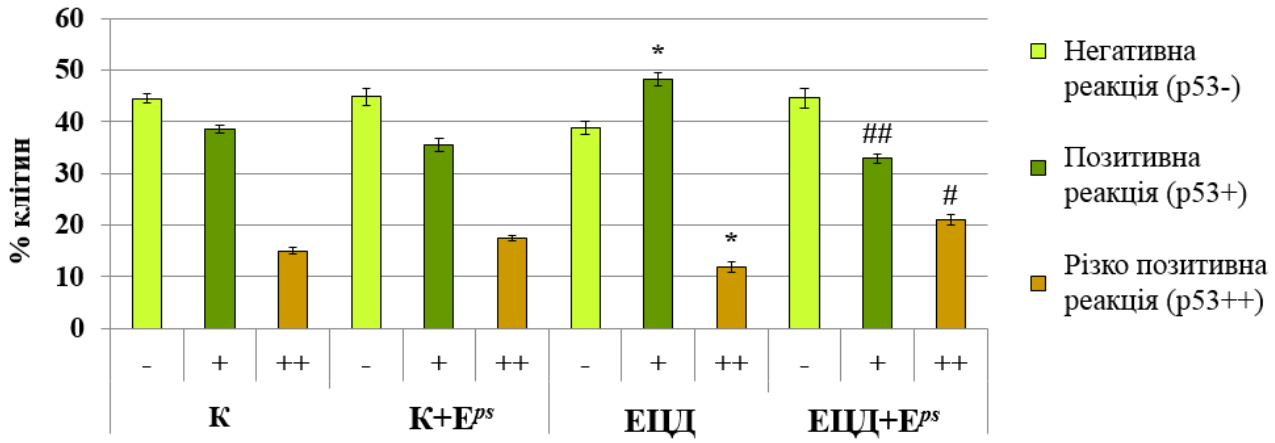

Рис. 3.13. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту у клітині p53 у нормі та за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

Для з’ясування біохімічних механізмів розвитку апоптозу важливе значення має дослідження дії чинників, які здатні запобігати запуску програми загибелі.

На фоні збільшення кількості лейкоцитів з позитивною реакцією на вміст проапоптичного білка p53 спостерігали зниження кількості цих клітин з позитивною (на 62%) та різко позитивною (на 91%) реакцією на вміст антиапоптичного білка Bcl-2 у тварин з ЕЦД (рис. 3.14-3.15). Виявлений дисбаланс кількісного співвідношення білків-регуляторів апоптозу є ознакою посилення апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД.

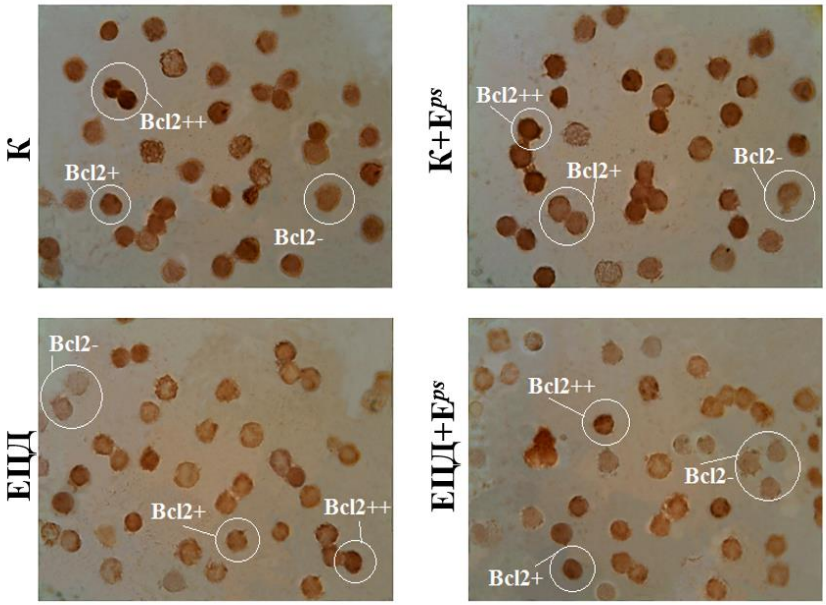

Рис. 3.14. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до білка Bcl-2 за умов введення E^{ps} контрольним тваринам та щурам з ЕЦД

У тварин контрольної групи, яким вводили E^{PS} не відмічено статистично вірогідних змін вмісту білків p53 і Bcl-2 (рис. 3.14 .– 3.15).

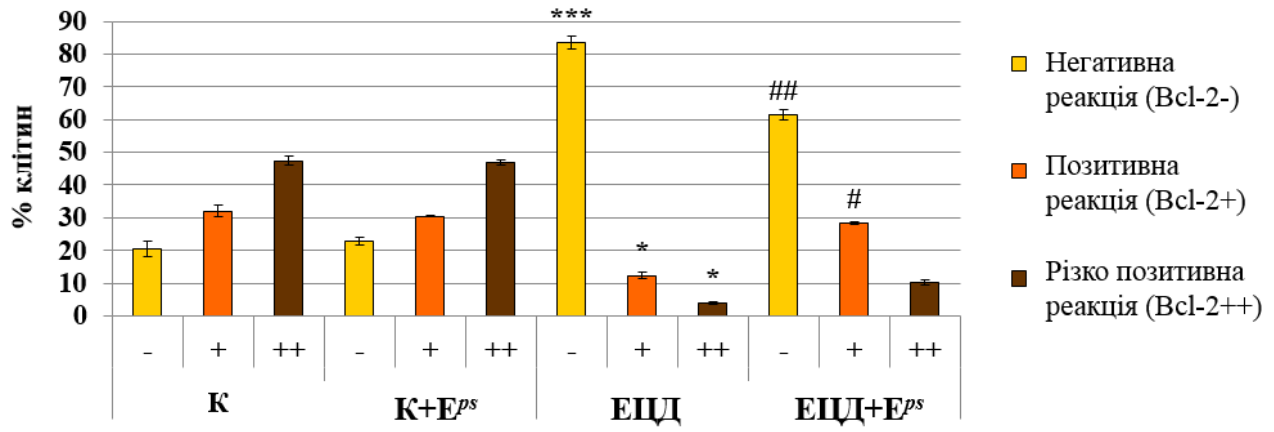

Рис. 3.15. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту у клітині білка Bcl-2 у нормі та за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

Введення E^{ps} тваринам з ЕЦД призводило до достовірного зниження (на 32%) кількості клітин із позитивною реакцією на білок p53 (рис. 3.12, рис. 3.13). Водночас показано зростання кількості Bcl-2^{+} (на 133%) та Bcl-2^{++} (на 152%) клітин (рис. 3.14, рис. 3.15). Отримані дані дають підстави зробити висновок про коригуючий вплив E^{ps} на вміст про- (p53) і антиапоптотичного (Bcl-2) білків у лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД.

Детекцію ранніх проявів апоптозу лейкоцитів проводили за ступенем експонування фосфатидилсерину у зовнішньому ліпідному шарі плазматичної мембрани, що можна виявити за зв’язуванням із поверхнею клітини білка анексину V. Утворення гідроперекисів фосфатидилсерину порушує його взаємодію з білками цитоскелету і полегшує міграцію окисненого фосфатидилсерину з внутрішньої сторони мембранного бішару на зовнішню, що і є причиною його появи на зовнішній стороні мембрани при індукції апоптозу [205].

Застосування подвійного флуоресцентного фарбування клітин анексином V, міченим ФІТЦом та пропідій йодидом дає змогу здійснити детальну оцінку вираженості апоптотичних змін в лейкоцитах та отримати кількісний розподіл цих клітин крові на живі, клітини на ранніх стадіях апоптозу та клітини на пізніх стадіях апоптозу (табл. 3.5, рис 3.16).

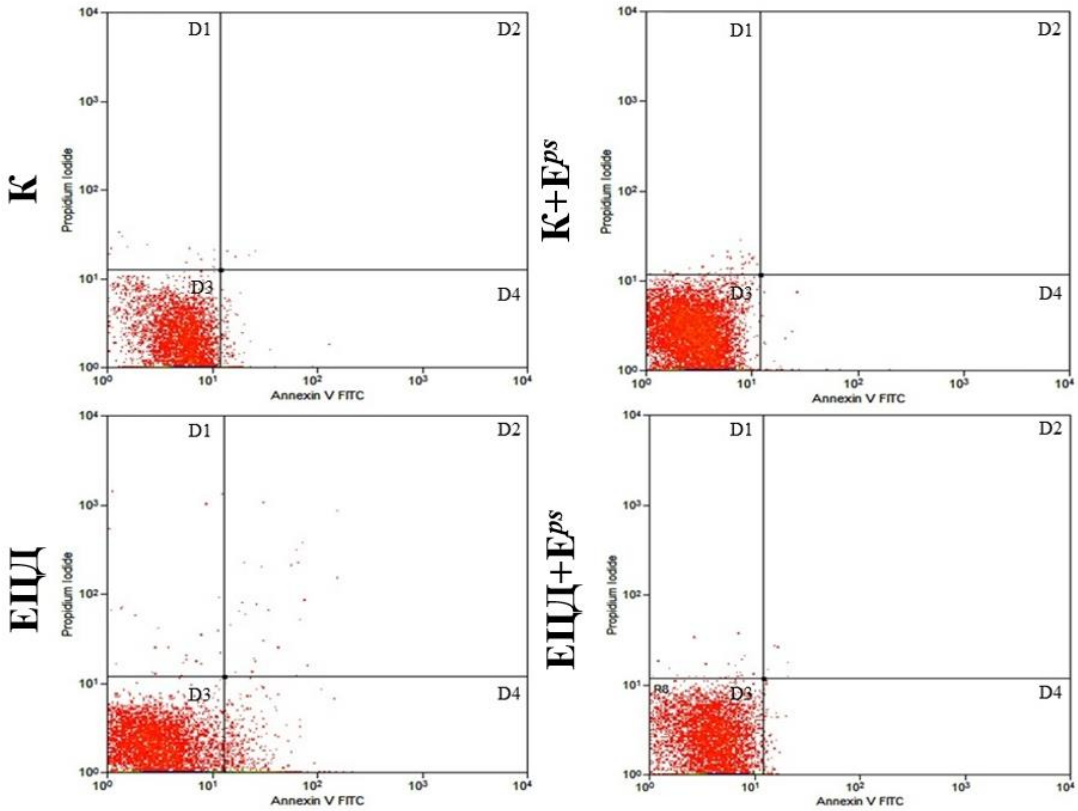

Рис. 3.16. Двовимірна точкова гістограма розподілу апоптичних і життєздатних клітин в режимі DotPlot (по осі абсцис – інтенсивність флюоресценції анексину V – FITC, по осі ординат – інтенсивність флюоресценції ПЙ). D3 (Анексин V^{-}/ПЙ$^{-}$) – живі клітини; D4 (Анексин V^{+}/ПЙ$^{-}$) – клітини з ранніми ознаками апоптозу; D2 (Анексин V^{+}/ПЙ$^{+}$) – клітини з пізніми ознаками апоптозу; D1 (Анексин V^{-}/ПЙ$^{+}$) – клітини у стадії некрозу

Дослідження апоптозу лейкоцитів методом проточної цитуфлоуриметрії дозволило виявити зростання кількості анексин-позитивних клітин при ЕЦД майже учетверо (табл. 3.5), що свідчить про посилення екстерналізації ФС на поверхні лейкоцитів. Водночас кількість анексин-позитивних клітин, які давали також позитивну реакцію при фарбуванні пропідій йодидом, зростала у 2,8 рази (табл. 3.5). Це є ознакою порушення цілісності мембрани і свідчить про зростання кількості клітин із ранніми та пізніми ознаками апоптозу.

Таблиця. 3.5.

Дослідження апоптозу лейкоцитів за зв'язуванням анексину V із поверхнею клітини та фарбуванням пропідій йодидом у нормі та за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

	Живі клітини АнексинV⁻/ПЙ, %	Клітини з ранніми ознаками апоптозу АнексинV⁺/ПЙ⁻, %	Клітини з пізніми ознаками апоптозу АнексинV⁺/ПЙ⁺, %	Клітини з ознаками некрозу АнексинV⁻/ПЙ⁺, %
К	96,41±1,7	2,75±1,92	0,0575±0,021	0,7825±0,3022
К+E^{ps}	99,51±0,07	0,11±0,04*	0,004±0,002*	0,378±0,058*
ЕЦД	87,56± 1,12*	10,38±0,58*	0,16±0,072*	1,907± 1,756
ЕЦД+E^{ps}	98,12±0,26#	1,398±0,31#	0,04 ± 0,015#	0,442±0,067#

Введення E^{ps} тваринам з ЕЦД супроводжувалося значним зниженням кількості клітин із ранніми (у 7,4 рази) та пізніми (у 4 рази) ознаками апоптозу (табл. 3.5).

Таким чином, при дослідженні апоптозу лейкоцитів встановлено, що введення тваринам E^{ps} проявляє пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель лейкоцитів, інтенсивність якої значно підвищується за умов діабету. Хронічна гіперглікемія за умов ЦД призводить розвитку оксидативно-нітративного стресу, в ході якого утворюються продукти, що виявляють потужну проапоптотичну дію. Тому, встановлений біологічний ефект досліджуваного екстракту ми пов'язуємо з наявністю у його складі біологічно активних речовин з гіпоглікемічною та антиоксидантною дією.

3.6. Вплив E^{ps} на процеси проліферації та диференціації попередників лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД

Високий рівень глюкози у крові спричиняє виникнення запальних процесів, на що в першу чергу реагують клітини крові, зокрема лейкоцити. Реакція організму на розвиток запального процесу проявляється у стимуляції кровотворення, виході лейкоцитів з резервного пулу кісткового мозку у кров та імміграції лейкоцитів з крові у вогнище запалення. Тому наступним етапом роботи було дослідження впливу E^{ps} на процеси проліферації та диференціації кістковомозкових попередників лейкоцитів у нормі та за умов ЕЦД.

Методом імуноферментного аналізу, що дає змогу кількісно оцінити рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину було встановлено, що за умов ЕЦД відбувається значне підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у S-фазі мітотичного циклу, зокрема, рівень включення в проліферуючі клітини 5-бром-2'-дезоксиуридину був вищим у 3,9 разів, порівняно з контролем. Введення E^{ps} 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. 3.17).

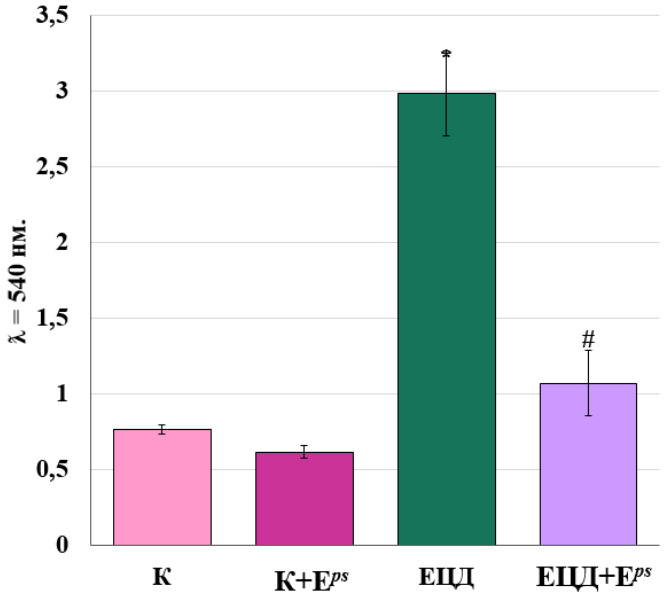

Рис. 3.17. Рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину у нормі, при ЕЦД та за умов введення E^{ps}

Для підтвердження коригуючого впливу E^{ps} на процеси проліферації та диференціації попередників лейкоцитів периферичної крові щурів на клітинному рівні нами було проведено цитологічні дослідження препаратів клітин білого ростка кісткового мозку.

Аналізуючи показники морфологічного складу попередників лейкоцитів за ЕЦД було виявлено вірогідне збільшення кількості лімфобластів на 28,31 % порівняно із контролем (табл. 3.6.).

Таблиця. 3.6

Морфологічний склад клітин білого ростка кісткового мозку у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення E^{ps} (M ± m, n = 5–6)

Тип клітин		Варіант досліду			
		К	К +E^{ps}	ЕЦД	ЕЦД+E^{ps}
Мієлобласти,%	базофільні	0,83±0,11	0,45±0,09*	0,77±0,12	0,48±0,07
	еозинофільні	1,08±0,25	0,39±0,12*	0,69±0,19	0,78±0,12
	нейтрофільні	18,54±1,21	13,53±0,89*	12,78±1,39*	12,42±1,17
Паличкоядерні гранулоцити, %	базофільні	0,19±0,12	0,11±0,08	0,4±0,14	–
	еозинофільні	0,35±0,23	0,37±0,19	0,32±0,22	0,41±0,13
	нейтрофільні	15,67±2,38	13,89±0,28	10,84±1,86	13,04±0,83
Сегментно-ядерні гранулоцити,%	базофільні	–	–	0,04±0,04	–
	еозинофільні	0,05±0,04	–	–	–
	нейтрофільні	1,58±0,35	0,56±0,17*	1,1±0,15	0,67±0,23#
Лімфобласти, %		34,31±1,74	38,56±2,07	49,48±2,67*	42,26±2,34#
Лімфоцити, %		27,40±3,03	32,13±2,85*	23,60±2,36	30,95±1,81#

Результати мієлограми клітин білого ростка тварин з ЕЦД узгоджуються із даними імуноферментного аналізу щодо рівня включення в проліферуючі клітини аналога тимідину і свідчать про інтенсифікацію лейкопоезу.

При введенні E^{ps} було зафіксовано зниження кількості лімфобластів на 15,45% та збільшення кількості лімфоцитів на 31,14% у тварин з ЕЦД та зниження кількості лімфоцитів у контролі.

Відомо, що диференціацію різних типів клітин стимулює ФНП-α [136]

У групі тварин зі стрептозотоциновим діабетом встановлено зростання вмісту ФНП-α на 46 %, порівняно з контролем (рис. 3.18). Відомо, що ФНП-α потенціює дію ІЛ-3 і GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)*, що сприяє збільшенню кількості клітин-попередників лейкоцитів. Також відома роль ФНП-α у захисті ранніх попередників клітин крові від дії цитостатиків [219].

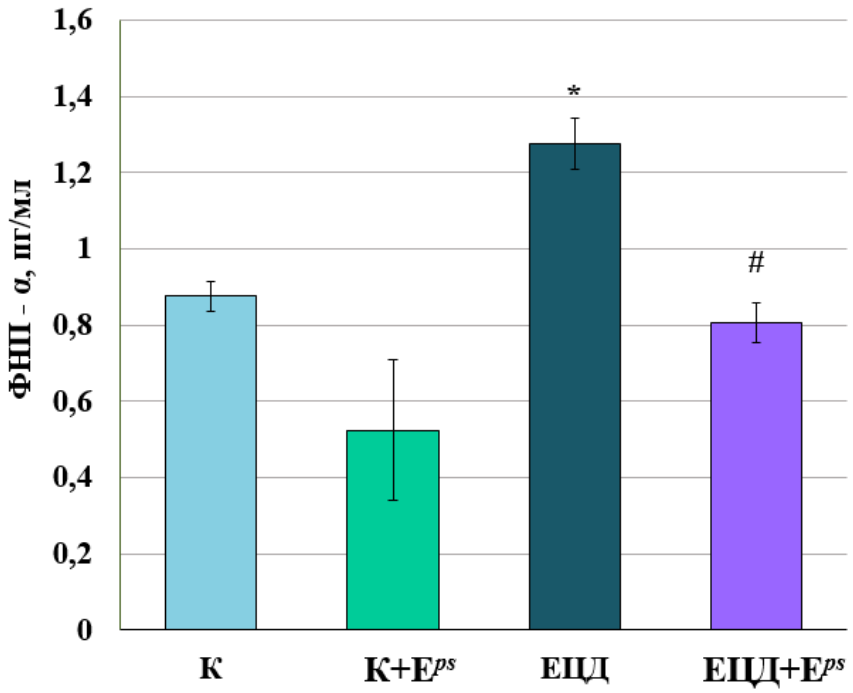

Рис 3.18. Вміст ФНП-α у нормі, за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам введення тваринам E^{ps} (M ± m, n = 4–5)

У тварин з ЕЦД, яким вводили E^{ps} спостерігали зниження вмісту ФНП-α, що узгоджується зі змінами показників, які характеризують проліферативну активність клітин білого ростка кісткового мозку.

3.7. Дослідження процесу полімеризації актину у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення E^{ps}

Реорганізація актинового цитоскелету у результаті полімеризації – деполімеризації актину має важливе значення для здійснення локомоторних функцій лейкоцитів і є ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності цих клітин. Зниження здатності до хемотаксису, а також фагоцитарної і бактерицидної активності лейкоцитів, яке корелює з високим рівнем глюкози крові, призводять до розвитку інфекційно-запальних процесів, ускладнюючи перебіг основного захворювання.

Процес полімеризації актину лежить в основі механізмів формування стресових фібрил, утворення ламелоподій і філоподій, тобто у зміні стану клітини, що забезпечують її морфологічну цілісність і функціональную активність. Серед основних структур цитоскелету клітини найбільшої уваги заслуговує його актинова складова, яка є найлабільнішою та швидко реагує на різноманітні впливи [11, 26].

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. 3.19 А, Б). Оцифровані результати інтенсивності сигналів флуоресценції на мікрофотографіях представлені середнім показником флюорисценції (середнім арифметичним значенням сили свічення суспензії клітин (2×10^4)), який виражали в у.о..

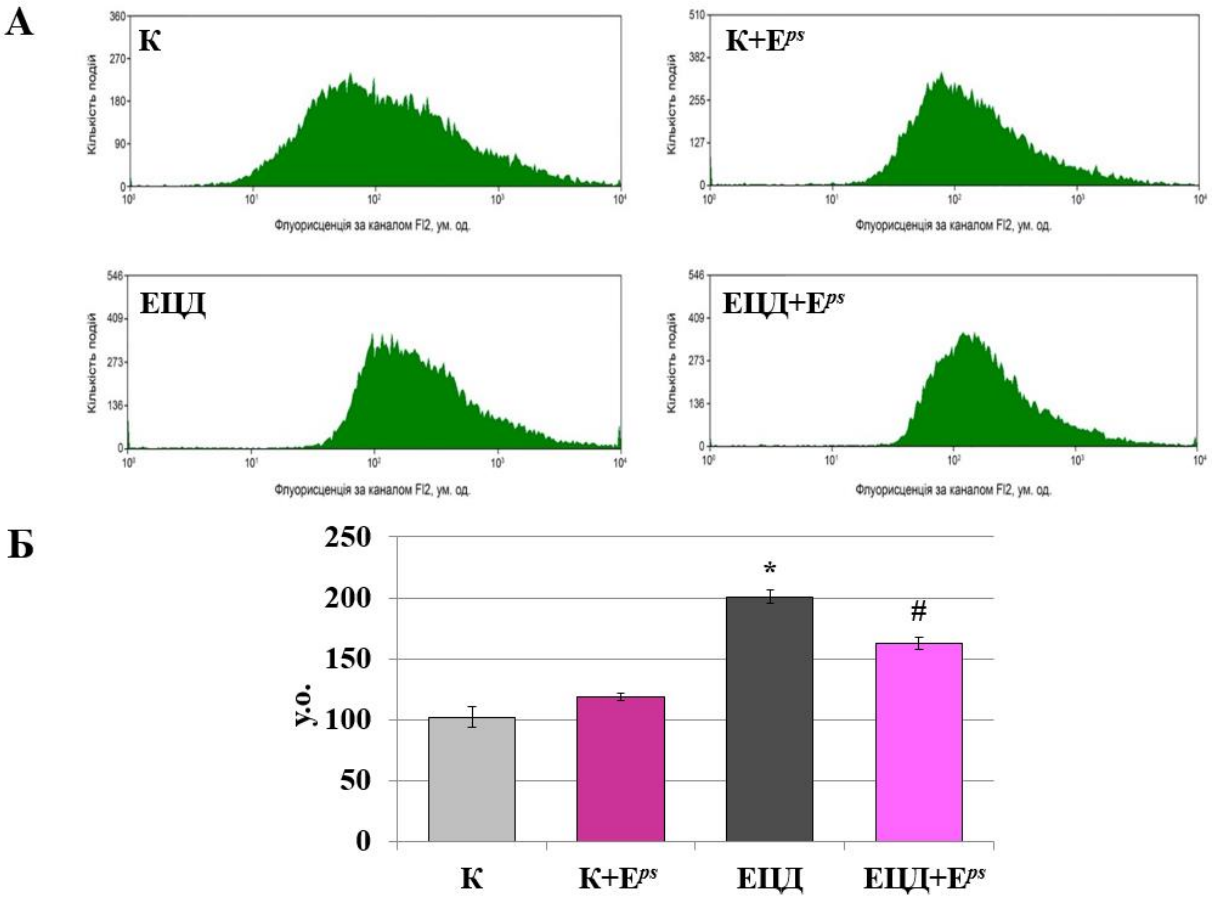

Рис. 3.19. А - Гістограми інтенсивності флуоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ у лейкоцитах периферичної крові щурів;

Б - оцифровані дані гістограм, що відображають рівень полімеризованого актину у цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флуоресценції фаллоїдин – ТРІТЦ

Аналізуючи результати проведених досліджень, було встановлено що вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові за ЕЦД був достовірно вищим порівняно з контрольною групою тварин.

Підвищення рівня полімеризованого актину призводить порушення відповіді клітини під час інтегрин-залежної взаємодії, внаслідок чого послаблюється адгезія лейкоцитів з ендотеліальними клітинами та порушується проникнення лейкоцитів через судини під час запального процесу [1].

При введенні E^{ps} тваринам з ЕЦД вміст F-актину в лейкоцитах достовірно знижувався (на 20%), порівняно з діабетом, проте перевищував контрольні значення (рис. 3.19).

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}.

Актин – білок, який існує у двох фізіологічних станах: мономерного глобулярного (G-актину) та полімерного або фібрилярного (F-актину). У клітинах F-актин представлений довгими мікрофіламентами (конститутивна фракція цитоскелету), які відходять від клітинної мембрани у напрямку до центру клітини, та короткими мікрофіламентами, які розташовуються у кортексі у підмембранній сітці. Короткі філаменти утворюють дуже динамічну фракцію, адже саме вони утворюються першими при ініціації полімеризації актинових філаментів мембрани (субкортикальний актин) у момент активації лейкоцитів і формування псевдоподій на їхній поверхні [70].

На рис. 3.20. наведено результати імуноблот-аналізу актинових філаментів цитоскелету, коротких філаментів і мономерів актину.

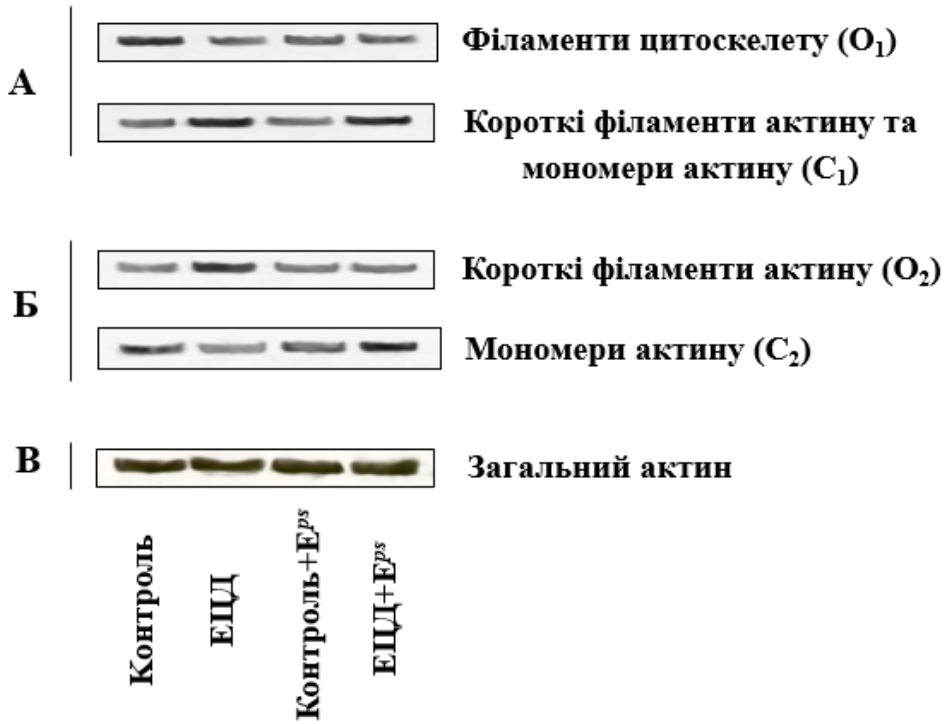

Рис. 3.20. Дослідження методом імуноблот-аналізу рівня актину у лейкоцитах щурів у нормі, за умов ЕЦД та при введенні E^{ps}

А: Імуноблот-аналіз фракцій, що містили довгі актинові філаменти цитоскелету (O_1) та суміш коротких філаментів і мономерів актину (C_1). Однакові аліквоти кожної фракції лізату вносили в одну лунку гелю.

Б: Імуноблот-аналіз фракцій, що містили короткі філаменти (O_2) і мономери актину (S_2). Однакові аліквоти кожної фракції наносили на гель. Однакові аліквоти кожної фракції лізату вносили в одну лунку гелю.

В: В: Імуноблот-аналіз загальної фракції актину, що містить довгі актинові філаменти цитоскелету (O_1), короткі філаменти (O_2) і мономерів актину (C_2).

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. Ці результати вказують на те, що процес полімеризації актину при діабеті інтенсифікується. Окрім того, слід зазначити, що у разі ЕЦД лейкоцити характеризуються високим вмістом коротких актинових філаментів, що у 3,1 рази перевищує контрольні значення (рис. 3.20, Б, рис. 3.21).

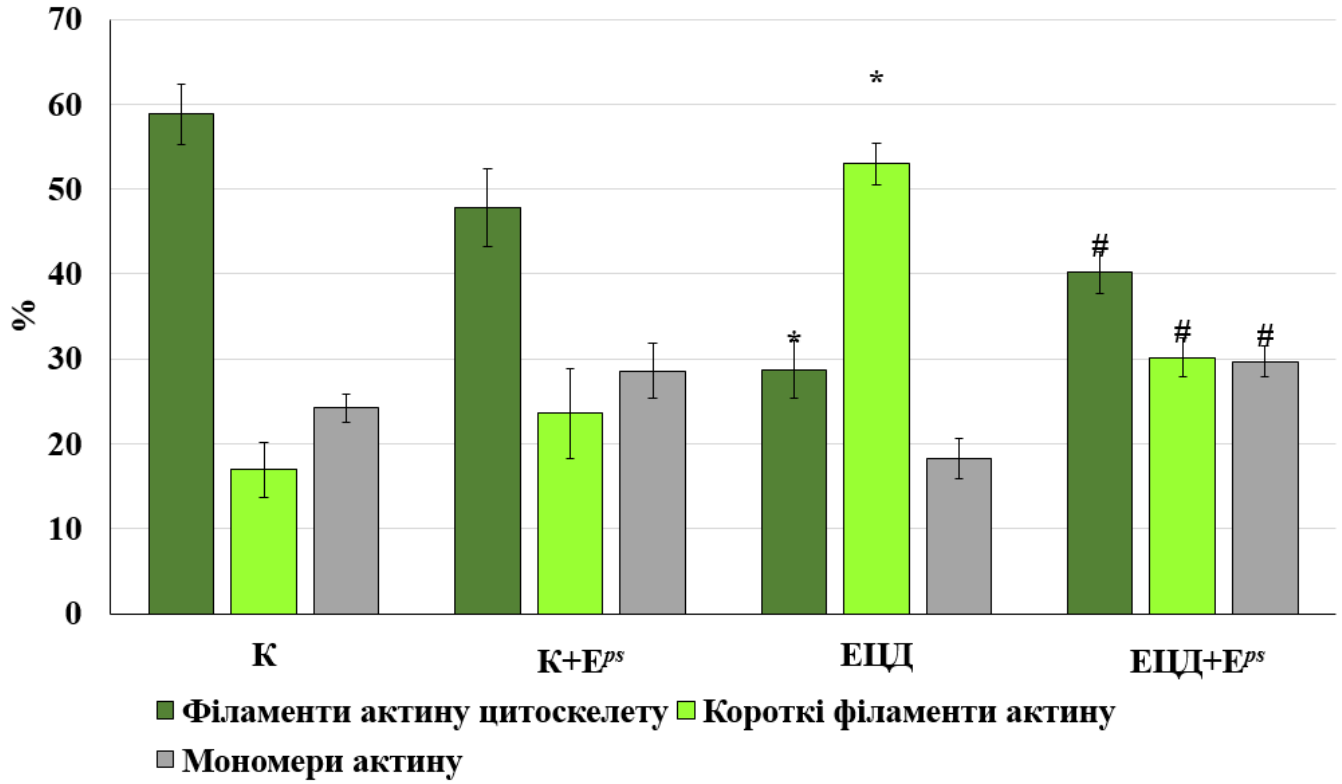

Рис. 3.21. Загальний вміст актину у лізатах лейкоцитів та вміст актину у фракціях лізатів цих клітин, що містили довгі актинові філаменти, короткі філаменти та мономери актину. Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів (рис. 3.20, А-В). Вміст актину у кожній фракції виражений як відсоток від загального вмісту актину визначений для відповідної групи Вміст актину у заг. Лізаті забрати і граф. І діаграму

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. 3.20, Б, рис. 3.21).

Методом імуноблот-аналізу показано, що загальний рівень актину у лейкоцитах тварин не змінювався порівняно з контролем. Це дає змогу зробити висновок про те, що встановлене нами двократне підвищення рівня F-актину у лейкоцитах за цієї патології є специфічним і відбувається завдяки зниженню рівня G-актину (рис. 3.20, В).

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. 3.20, А-Б, рис. 3.21).

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. Зокрема, після введення E^{ps} у тварин з ЕЦД вміст коротких актинових філаментів у лейкоцитах знижувався у 2,2 рази, водночас збільшувався вміст мономерів актину та філаментів цитоскелету (у 2,5 та 1,3 рази відповідно) порівняно з аналогічними фракціями за ЕЦД без введення екстракту. Тоді як введення екстракту тваринам контрольної групи призводить до деполімеризації актинових філаментів цитоскелету у результаті

інтенсифікації полімеризації у фракції коротких філаментів, порівняно з контролем (рис. 3.20, А-Б, рис. 3.21).

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 (фітол, етиловий ефір пальмітинової кислоти, кампестерол, стігмастерол, α-амірин) [223] і таким чином здатні пригнічувати процеси глікозилювання, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету. З літературних джерел відомо, що кінцеві продукти глікозилювання індукують процес полімеризації актину [36].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Цукровий діабет 1 типу характеризується прогресуючою автоімунною деструкцією β-клітин підшлункової залози, у разі чого може виникати дефіцит інсуліну. Це призводить до метаболічних та функціональних порушень основних ланок обміну вуглеводів, ліпідів, білків та розвитку гіперглікемії [64, 180]. Хронічна гіперглікемія за ЦД є основним патогенетичним чинником розвитку діабетичних ускладнень.

На фоні гіперглікемії активується ряд метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення активних АФО, зокрема: $\bullet O_2^-$, •OH, генерування яких переважно здійснюється через систему НАДФН-оксидази у багатьох клітинах, а також NO й NOO^- тощо. Ці реакційно активні молекули діють на β-клітини підшлункової залози і можуть зумовлювати їхню апоптотичну загибель [57, 180]. У свою чергу, інтенсифікація оксидативно-нітративного стресу при діабеті 1 і 2 типів спричинює модифікацію протеїнів, активацію сигнальних шляхів, активацію запальних процесів, що сприяє загибелі клітин у багатьох тканинах живих організмів і є характерним для обох його типів. Тобто, пошкодження різних типів клітин та їхня загибель значною мірою залежить від надмірного утворення АФО й АФН, що призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу в клітинах [98, 180]. Слід зазначити, що ДНК, ліпіди і білки клітин є основними мішенями для АФО, оскільки виникає дисбаланс між утворенням та знешкодженням вільних радикалів.

Високий рівень глюкози крові спричиняє виникнення запальних процесів, на що в першу чергу реагують клітини крові, зокрема лейкоцити [139]. Лейкоцити відіграють важливу роль у розвитку процесу запалення, їх прилипання до стінок артерій є початком розвитку атеросклерозу [130, 180].

Експериментальні дослідження демонструють значні порушення морфофункціонального стану імунокомпетентних клітин крові за ЦД. Порушення

міграційної здатності, а також зниження фагоцитарної і бактерицидної активності лейкоцитів, яке корелює з високим рівнем глюкози крові призводять до розвитку інфекційно-запальних процесів, ускладнюючи перебіг основного захворювання [2].

Наслідками порушень викликаних оксидативно-нітративним стресом є виникнення діабетичних ускладнень. 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 ЦД.

Лікування цукрового діабету є актуальною та водночас надзвичайно складною проблемою, вирішення якої потребує комплексних підходів з метою запобігання розвитку метаболічних, структурних та функціональних порушень в організмі. Безперечний науковий інтерес у цьому плані становлять фітопрепарати, які містять комплекс біологічно активних сполук, котрі впливають одночасно на декілька систем організму, що забезпечує позитивний клінічний ефект.

Таким чином, актуальним є пошук принципово нових за механізмом дії антидіабетичних препаратів, які знижуватимуть рівень глікемії, сприятимуть відновленню інсуліноутворюючої функції підшлункової залози, знижуватимуть інсулінорезистентність та нівелюватимуть шкідливі для організму прояви оксидативно-нітративного стресу, який завжди розвивається за цукрового діабету. З цієї точки зору актуальними є дослідження, які спрямовані на розробку нових лікарських засобів з цукрознижуючими та антиоксидантними властивостями.

Використання синтетичних цукрознижувальних препаратів та фітотерапевтичних засобів, які зараз є у арсеналі лікарів не є альтернативою застосування інсуліну. Але фітотерапія здатна проявити суттєву підтримку стандартному способу лікування на всіх стадіях захворювання, а на ранніх етапах деколи спроможна на певний період замінити традиційне лікування. Доведено, що пацієнти, які активно використовують фітотерапію, потребують нижчих доз інсуліну і пероральних цукрознижувальних ліків. Традиційна фармакологічна

терапія ЦД зменшує ризик діабетичних ускладнень, але вона не в змозі забезпечити довготривалу нормалізацію метаболічних порушень [169].

Перспективною рослинною сировиною, яку можна використати для розробки антидіабетичних фітопрепаратів є *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський, галега лікарська). Вона широко використовується у народній медицині, але високий вміст алкалоїдів робить її непридатною для використання у великих кількостях. Використовуючи метод фракціонування екстракту галеги лікарської з метою видалення токсичних алкалоїдів [211] було отримано фракцію, збагачену компонентами, що потенційно мають цукрознижувальну та антиоксидантну дію і не є токсичними у високих концентраціях.

Отриману БФЕГЛ було стабілізовано додаванням біогенних поверхнево активних речовин, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas sp.* PS-17. Проведені дослідження показали, що додавання біоПАР у концентрації 3,3 г/л до вихідної суміші БФ ЕГЛ дозволяє отримати стійку дрібнодисперсну емульсію. Таку емульсію легше вводити через зонд піддослідним тваринам, що забезпечує чітке дотримання певного дозування діючих речовин.

Бактерії роду *Pseudomonas* sp. синтезують рамноліпіди, що переводять гідрофобні субстрати у доступну для клітин форму [120]. Стійкість емульсій зростає за умов утворення на твердих частинках сольватної оболонки, яка перешкоджає злипанню часток та випаданню їх в осад. Як відомо, ПАР в незначних кількостях у дисперсійному середовищі забезпечують утворення таких оболонок, що дозволяє одержати емульсію із характеристиками стабільного препарату [58].

Були запропоновані два можливих механізми взаємодії між гідрофобними субстратами, водною фазою і ПАР, завдяки яким біосурфактанти посилюють біодеградацію слаборозчинних органічних компонентів. Згідно першому механізму, рамноліпіди розчиняють гідрофобні компоненти всередині міцелярних структур, посилюючи розчинність у воді органічних речовин та їх доступність для поглинання клітинами. Другий механізм пов'язують зі здатністю рамноліпідів збільшувати

гідрофобність клітинної мембрани, посилюючи таким чином прямий контакт між клітинами і слаборозчинним субстратом [59, 216].

Газохроматографічнй аналіз компонентного складу екстракту цієї рослини дав змогу ідентифікувати низку біологічно активних речовин з потенційною цукрознижувальною: фітол (3,68%), етиловий естер пальмітинової кислоти (15,480%), фітостероли (кампестерол (1,97%) й стігмастерол (14,72%), похідні хіназоліну (2,89%), антиоксидатною: фітол (3,68%), флавоноїди (2,98%), вітамін Е (0,46%), ліноленова кислота (33,029%), інозитолом (3,1%) та протизапальною метиловий естер ліноленової кислоти (33,029%), α- амірин (1,932%) дією.

Нашими дослідженнями доведено виражену цукрознижувальну дію E^{ps} на моделі стрептозотоцинового діабету. На фоні підвищення концентрації С-пептиду та інсуліну встановлено зниження вмісту глюкози й глікозильованого гемоглобіну у крові щурів та підвищення толерантності клітин до цього моносахариду. Водночас, нами не було виявлено гіпоглікемічного ефекту у разі введення досліджуваного екстракту тваринам контрольної групи. Це вказує на те, що E^{ps} впливає на метаболізм глюкози лише за умов підвищеної її концентрації, зокрема, при ЕЦД.

На основі газохроматографічного визначення компонентного складу E^{ps} можна припустити, що його цукрознижувальна дія може бути зумовлена наявністю у його складі фітолу (3,68 %), який здатний знижувати інсулінорезистентність, підвищувати чутливість м’язів до інсуліну, пригнічувати глюконеогенез та регулювати метаболічні розлади, які супроводжують діабет, завдяки активації RXR (retinoid X receptor), що призводить до посилення експресії гена GLUT2 та мРНК глюкокінази [48].

Естери пальмітинової кислоти, вміст яких у досліджуваному екстракті становить 15,48 %, викликає дозозалежне зниження глюкози в плазмі крові у тварин з експериментальним цукровим діабетом [135].

У складі одержаного нами екстракту виявлено високий вміст фітостеролів (кампестерол і стігмастерол), зокрема їх вміст становить 1,97 % та 14,72 %, відповідно. Присутні у складі екстрактів фітостероли окрім здатності інгібувати

адсорбцію холестеролу, здатні знижувати рівень глікозильованого гемоглобіну [90, 151].

Серед біологічно активних речовин E^{ps} з гіпоглікемічною дією можна виділити α-амірин вміст якого в екстракті становить 1,93 %. α-Амірин здатний впливати на систему канабіноїдів. Показано, що деякі ліганди до канабіноїдних рецепторів CB1 можуть прямо зв'язуватись та алостерично регулювати Kir6.2/SUR1 АТФ-залежні калієві, тим самим контролюючи глюкозостимульоване вивільнення інсуліну. Крім цього α-амірин завдяки своїм протизапальним та антиоксидантним властивостям виявляє позитивний вплив на стан тварин зі стрептозотоциновим цукровим діабетом [134].

Особливої уваги заслуговує високий вміст у досліджуваному екстракті α-ліноленової кислоти (33,03 %). Відомо, що омега-3 поліненасичені жирні кислоти 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 [129].

Показано, що похідні хіназоліну здатні знижувати рівень глюкози в крові [208]. Серед таких речовин у досліджуваних екстрактах нами було виявлено 2-метил-1,2,3a,4,5-гексагідропіроло-[1,2-a] хіназолін (2,89 %).

Отже, на основі аналізу якісного і кількісного складу біологічно активних речовин E^{PS} можна стверджувати, що його цукрознижуючий ефект зумовлений наявністю у складі фітолу, етилового естеру пальмітинової кислоти, фітостеролів (кампестеролу та стігмастеролу), похідними хіназоліну або їхньою синергічною дією.

Ефективну гіпоглікемічну дію E^{ps} за досліджуваної патології підтверджують гістологічні дослідження підшлункової залози. 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 Натомість встановлено виражену

цитопротекторну дію цього екстракту на клітини підшлункової залози при введенні його у дозі 1,2 г/кг маси тіла, про що свідчить статистично достовірне збільшення показника щільності розташування острівців Лангерганса, їх індивідуальних показників, кількості інкреторних клітин. Виявлено відносно збережені β-клітини з ознаками незначної вакуолізації цитоплазми і зниженням ступеня дегрануляції. При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози тварин контрольної групи і тварин, яким вводили E^{ps} не виявлено змін у структурній організації β-клітин підшлункової залози.

На сьогодні відомо, що гіперглікемія може призводити до підвищеного утворення АФО й АФН, які діють на β-клітини підшлункової залози і можуть зумовлювати їх апоптичну загибель [44]. Апоптоз β-клітин підшлункової залози є ключовою подією у патогенезі цукрового діабету 1-го типу. Ми припускаємо, що протекторний 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 пов’язані з дією АФО й АФН, які призводять до роз’єднання окисно-відновних процесів у мітохондріях, і викликають пошкодження ДНК, а відтак і загибель цих клітин шляхом апоптозу. Крім того, відомо, що важливою патогенетичною ланкою ЦД 1-го типу є розвиток запального процесу, який має автоімунний характер і призводить до загибелі β-клітин. Тому протекторний E^{ps} вплив на клітини підшлункової залози можна трактувати також виходячи з наявності у складі досліджуваного екстракту високого вмісту ліноленової кислоти, яка відома вираженими протизапальними властивостями [167].

Розвиток ЕЦД супроводжувався значним підвищенням базального рівня продукції АФО у лейкоцитах щурів, а також підвищенням активності NO-синтази та вмісту стабільних метаболітів NO порівняно з контрольною групою тварин, що свідчить про розвиток оксидативно-нітративного стресу за даного захворювання. Надпродукція АФО та АФН призводила до інтенсифікації процесів

вільнорадикального окиснення біосубстратів, про свідчить зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів та карбонільних груп білків у цих клітинах. Аналіз отриманих результатів свідчить про неспроможність АОС лейкоцитів реалізувати у повному обсязі захисні та адаптаційні механізми у разі оксидативно-нітративного стресу. Встановлено зниження активності ключових ферментів антиоксидантного захисту – СОД, каталази та ГПО. Причиною інактивації ферментів за даної патології може бути їхнє глікозилювання або ушкодження активованими кисневими метаболітами [171].

Введення E^{ps} попереджає розвиток оксидативно-нітритивного стресу у лейкоцитах щурів за стрептозотоцинового діабету забезпечуючи мобілізацію антирадикальних та 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 ключових ферментів АОС захисту. У групі здорових тварин антиоксидантна дія досліджуваного екстракту виражена у меншій мірі, ніж за умов ЕЦД.

Основними діючими компонентами екстракту, які виявляють антиоксидантні властивості є: фітол, флавоноїди та їх похідні, сквален, інозитол, вітамін Е та ліноленова кислота.

Дослідження *in vitro* продемонстрували антиоксидантні властивості фітолу, які зумовлені наявністю у складі молекули гідроксильної групи [40]. Скавенджером гідроксильних радикалів також виступає сквален, який є ефективнішим антиоксидантом, ніж ендогенний відновлений глутатіон (GSH). Сквален є ліпофільною сполукою, і тому може легко проходити через ліпідний бішар у внутрішньоклітинні компартменти, що сприяє прояву його антиоксидантних властивостей [38]. Підтвердженою антиоксидантною дією володіє інозитол [49, 51], яка полягає у захисті від окиснення полієнових жирних кислот (арахідонової). Також, інозитол може сам реагувати з глюкозою, запобігаючи її зв’язуванню з

білками кришталика, що має вирішальне значення при розвитку діабетичної ретинопатії [28, 140].

Особливої уваги заслуговують флавоноїди, їх похідні (2(4H)-бензофуранон) та вітамін Е, які можуть слугувати пастками вільних радикалів, а при взаємодії з мембраною адсорбуватися на ній за допомогою численних водневих зв'язків, які виникають між функціональними групами ліпідів та гідроксильними і карбоксильними групами флавоноїдів, забезпечуючи таким чином мембраностабілізуючий ефект [82, 224].

Відомо, що ліноленова кислота чинить інгібуючий вплив на індуковану ліпополісахаридом експресію генів індуцибельної NO-синтази, циклооксигенази-2 завдяки блокування NF-kB і МАРК-кінази [126].

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок про те, що біологічно активні компоненти E^{ps} запобігають розвитку оксидативно-нітративного стресу за ЕЦД завдяки їхньої здатності скавенджерувати вільні радикали та запобігаючи інгібуванню ключових компонентів ензиматичної ланки АОС.

Хронічна гіперглікемія є основним патогенетичним чинником при цукровому діабеті, що обумовлює утворення АФО, активацію індуцибельної NO-синтази, продукування NO, утворення пероксинітриту та високореакційноздатних гідроксильних радикалів, які пошкоджують ДНК у клітинах-мішенях. Тому наступним етапом нашої роботи було вивчення особливостей апоптозу лейкоцитів здорових щурів і тварин з ЕЦД на фоні введення досліджуваного екстракту.

Відомо, що при дії факторів, які провокують порушення структури ДНК, у клітині підвищується рівень проапоптотичного білка p53. Завдяки своїй транскрипційній функції цей протеїн здатний активувати гени, що беруть участь в індукції загибелі клітини шляхом апоптозу. Також p53 здатний безпосередньо індукувати апоптоз шляхом запуску каспазного каскаду по мітохондріальному шляху. На даному етапі важливим елементом у ініціації апоптотичної загибелі клітини є співвідношення між індукторами та репресорами цього процесу. Особливого інтересу у цьому відношенні заслуговує Bcl-2 [222].

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 апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД.

Результати досліджень інших авторів щодо участі білка p53 в патогенезі ЦД та одержані нами дані дають змогу стверджувати про інтенсифікацію апоптозу лейкоцитів за досліджуваної патології. На тваринній моделі мишей лінії Nod було продемонстровано, що стан гіперглікемії індукує p53-опосередкований апоптоз. Також у пацієнтів із ЦД 1 типу в сироватці крові було виявлено анти-p53-аутоантитіла та зафіксовано збільшення інтенсивності p53-індукованого апоптозу. Відомо, що вміст p53 може різко підвищуватись за впливу різних стресових чинників, здатний не тільки активувати гени, що відповідають за індукцію апоптозу, а й безпосередньо брати участь в індукції мітохондріального шляху клітинної загибелі [222].

Після активації p53 здатний надходити з цитоплазми в мітохондрії, де піддається деубіквітинуванню та вступає у взаємодію з BH4-доменом антиапоптичних білків Bcl-XL і Bcl-2, що індукує вивільнення і активацію проапоптичних білків Bax та Bid, вихід цитохрому с та індукцію апоптозу навіть без транскрипційної активації проапоптичних генів мішеней p53. Індукція апоптозу під дією p53, мабуть, є першою і дуже швидкою реакцією на масштабні ушкодження Наступний етапом індукції апоптозу відбувається тільки через 6–7 годин і є результатом транскрипційної активності p53 в ядрі [222]. Таким чином, p53 здійснює як швидкі відповіді на сильні стреси, так і реалізує сповільнену, але дуже ефективну програму апоптозу пошкоджених клітин.

Відомо, що продукт онкогену bcl-2 – білок Bcl-2 інгібує p53-залежний і незалежний шляхи апоптозу, сприяє утворенню у мітохондріях іонних каналів, що стабілізує мітохондріальну цитохром с-оксидазу, яка здатна ініціювати активацію

каскаду каспаз і деградацію ДНК, а також зв'язує білки, які задіяні в апоптозі [175, 179].

У тварин контрольної групи, яким вводили E^{PS} не відмічено статистично вірогідних змін вмісту білків p53 і Bcl-2. Натомість у разі введення цього екстракту , тваринам з ЕЦД виявлено його коригуючий вплив на вміст про- (p53) і антиапоптотичного (Bcl-2) білків у лейкоцитах периферичної крові щурів за ЕЦД.

Одним із ранніх ознак апоптотичних змін в еукаріотичних клітинах є екстерналізація на зовнішню сторону клітинної мембрани фосфатидилсерину, що можна виявити за зв'язуванням із поверхнею клітини протеїну анексину V [205]. Дослідження апоптозу методом протокової цитуфлоуриметрії із застосуванням подвійного флуоресцентного фарбування клітин анексином V, міченим ФІТЦом, та пропідій йодидом дало змогу одержати інформацію про кількісне співвідношення клітин із ранніми та пізніми ознаками апоптозу із ознаками некрозу. З'ясовано, що за умов ЕЦД відбувається збільшення кількості клітин із ранніми і пізніми ознаками апоптозу, а також некротичних клітин. Введення E^{ps} контрольним тваринам та тваринам з ЕЦД супроводжувалося зниженням кількості анексин-позитивних клітин та анексин-позитивних клітин, які давали також позитивну реакцію при фарбуванні пропідій йодидом, що свідчить про коригуючий вплив E^{ps} на генетично запрограмовану загибель лейкоцитів, інтенсивність якої значно підвищується за умов діабету.

Ми припускаємо, що антиапоптична дія досліджуваного екстракту зумовлена наявністю у його складі компонентів з антиоксидантними властивостями, оскільки багаточисельними дослідженнями показано захисний ефект антиоксидантів у процесі апоптозу [131], а також α-ліноленової кислоти та її ефірів, які здатні знижувати прояви апоптозу індукованого високою концентрацією глюкози [224]. Також є літературні дані, які підтверджують антиапоптичний ефект монотерперноїдної сполуки лоліоліду, який виявлений в отриманому нами екстракті галеги лікарської (1,339%) [165].

Наступним етапом роботи було з’ясувати вплив E^{ps} на процеси проліферації і диференціації клітин-попередників лейкоцитів дослідивши рівень включення у проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксиуридину методом імуноферментного аналізу та проаналізуваши морфологічний склад клітин білого ростка кісткового мозку у контрольних тварин і тварин з ЕЦД. Показано зростання рівня включення в проліферуючі клітини 5-бром-2'-дезоксиуридину за умов ЕЦД, що свідчить про підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у S-фазі мітотичного циклу. Посилення проліферативної активності кістковомозкових попередників лейкоцитів за ЕЦД є компенсаторною реакцією організму, що виникає у відповідь на зниження кількості лейкоцитів периферичної крові врезультаті інтенсифікації апоптозу. Введення E^{ps} тваринам контрольної групи не призводило до статистично вірогідних змін досліджуваного показника, тоді як у тварин з ЕЦД його рівень істотно знижувався.

Аналіз показників мієлограми дає змогу стверджувати, що встановлене нами підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у тварин хворих на діабет відбувається завдяки збільшення кількості лімфобластів. Однак, кількість зрілих лімфоцитів є значно зниженою, що може свідчити про прискорений їх вихід із пулу кісткового мозку в русло крові.

Ключову роль в імунопатогенезі автоімунного ЦД відіграють цитокіни, зокрема ФНП-α [12, 123, 193, 209]. За фізіологічних умов ФНП-α слугує імуномодулятором, бере участь у процесах проліферації та диференціації різних типів клітин, впливає на апоптоз та стимулює продукцію різних цитокінів [136, 137, 162]. Основними клітинами продуцентами цього цитокіну є активовані макрофаги й Т-лімфоцити [137].

У тварин з ЕЦД спостерігали зростання вмісту ФНП-α. Не виключено, що підвищення концентрації цього цитокіну стимулювало процеси проліферації та диференціації попередників лейкоцитів. За введення E^{ps} діабетичним тваринам спостерігали зниження продукції ФНП-α у плазмі крові.

Нами не вивлено впливу E^{ps} на чисельність лімфобластів у тварин контрольної групи, натомість за ЕЦД їхня кількість знижується, що узгоджується з результати імуноферментного аналізу щодо включення аналога тимідину в проліферуючі клітини.

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 є центральною ефекторною функцією, яка визначає важливість цих клітин для розвитку імунної відповіді за всіх патологій, а особливо при аутоімунних процесах, до яких належить цукровий діабет 1-го типу. Процес полімеризації актину лежить в основі механізмів формування стресових фібрил, утворення ламелоподій і філоподій, тобто у зміні морфофункціонального стану клітини, узалежненого від білків цитоскелету. Тому, на наступному етапі досліджень ми вивчали вплив БФЕКЛ на процес полімеризації актину, як основу локомоторної функції лейкоцитів за умов ЕЦД.

Методом протокової цитометрії із застосуванням фалоїдину міченого флуоресцентним барвником ТРІТЦ встановлено зростання вмісту F-актину в лейкоцитах щурів у разі цукрового діабету 1-го типу, 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 субкортикальному актиновому шарі, який знаходиться у безпосередній близькості від плазматичної мембрани [70]. При введенні E^{ps} тваринам з ЕЦД вміст F-актину в лейкоцитах достовірно знижувався, проте перевищував контрольні значення.

Аналіз кількісного перерозподілу у загальному пулі полімеризованого актину між його конститутивною фракцією, представленою філаментами цитоскелету, та короткими актиновими філаментами показав, що у лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні підвищення загального рівня F-актину зменшується кількість актинових філаментів цитоскелету, водночас зростає вміст коротких філаментів актину.

Отримані результати дають змогу зробити висновок про те, що процес полімеризації актину при досліджуваній патології інтенсифікується при утворенні фракції коротких актинових філаментів.

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 [138, 212]. ФІ-3'-кіназа та її продукти беруть безпосередню участь у регуляції процесу утворення структур цитоскелету [133]. За наявності в клітині продуктів ФІ-3'-кінази (фосфатидилінозитол-3,4-дифосфату і фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату) від актинових філаментів дисоціюють кеп-білки, внаслідок чого активується полімеризація актину. Фосфатидилінозитоли також можуть виступати інгібіторами фосфорилювання актин-регуляторних білків. Ці білки-регулятори впливають на перерозподіл актинових філаментів – знижують вміст актинових філаментів цитоскелету і пропорційно викликають зростання рівня актину у фракції коротких філаментів і мономерів [81].

Після введення E^{ps} у тварин з ЕЦД вміст коротких актинових філаментів у лейкоцитах знижувався, водночас збільшувався вміст мономерів актину та філаментів цитоскелету порівняно з аналогічними фракціями за ЕЦД без введення екстракту. Тоді як введення екстракту тваринам контрольної групи призводить до деполімеризації актинових філаментів цитоскелету у результаті інтенсифікації полімеризації у фракції коротких філаментів, порівняно з контролем.

Отримані результати дають підстави стверджувати 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.

Ми припускаємо, що вплив досліджуваного екстракту на формування елементів цитоскелету за умов ЕЦД на фоні тривалої гіперглікемії найімовірніше зумовлений наявністю у його складі сполук, які виявляють гіпоглікемічну дію (фітол, етиловий ефір пальмітинової кислоти, кампестерол, стігмастерол, α-амірин) [223], а отже здатні пригнічувати процеси глікозилювання, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету. З літературних джерел відомо, що кінцеві продукти глікозилювання індукують процес полімеризації актину [36].

Актиновий цитоскелет є абсолютно необхідним для забезпечення амебоїдного руху лейкоцитів. Утворення псевдоподій співпадає у часі зі збільшенням кількості полімеризованого актину. WASP-білки та Arp2/3-комплекс (actin-related proteins 2 and 3) є центральними ланками у передачі внутрішньоклітинного сигналу, який викликає полімеризацію актину. Arp2/3-комплекс має високу спорідненість до «мінус»-кінців коротких актинових філаментів, і тим самим перешкоджає дисоціації мономерів актину. У відповідь на зовнішні стимули WASP-білки можуть переміщатися до зовнішньої мембрани клітин, де разом з білками Arp2/3-комплексу формують своєрідну «площадку», на якій відбувається регульований процес полімеризації актину. Комплекс Arp2/3 містить сім субодиниць, одна з яких p34-Arc глікозилюється за умов ЕЦД [107].

Позаклітинний сигнал, який запускає полімеризацію актину, сприймається мембранними рецепторними білками і передається на G-білки, які здійснюють контроль над актиновим цитоскелетом. За умов гіперглікемії відбувається фосфорилювання Ras-супресорного білка-1, який є представником низькомолекулярних G-білків [61]. Одним з ефекторів Ras, який відіграє важливу роль у Ras-опосередкованих сигнальних шляхах є ФІ-3’-кіназа [29]. Ras безпосередньо взаємодіють з каталітичною субодиницею ФІ-3’-кінази, що призводить до активації ліпофільної кінази в результаті її транслокації на мембрану і наступних конформаційних змін [25, 27]. Продукти ФІ-3'-кінази (фосфатидилінозитол-3,4-дифосфат і фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат) регулюють функціональну активність актинзв’язуючих білків, викликаючи

дисоціацію кеп-білків від актинових філаментів, і таким чином запускають їхню полімеризацію біля плазматичної мембрани [91]. Внаслідок цього може реорганізовуватися актиновий цитоскелет, що змінює морфологічний стан клітин і їхню здатність до руху.

Рецептори спряжені з G-білками активують ФІ-3'-кіназу γ, яка переважно експресується у гемопоетичних клітинах та відіграє ключову роль забезпеченні здатності нейтрофілів і макрофагів до хемотаксису. Під час активації ФІ-3'-кіназного сигнального шляху задіюються рецепторний апарат клітин та молекули адгезії [212, 215].

Встановлений нами коригуючий ефект E^{ps} на функціональний стан лейкоцитів може реалізуватися завдяки впливу на процеси реорганізації елементів актинового цитоскелету. Ми припускаємо, що вплив досліджуваного екстракту на формування елементів цитоскелету на фоні тривалої гіперглікемії за ЕЦД може бути зумовлений наявністю у його складі сполук, які виявляють гіпоглікемічну дію (фітол, етиловий ефір пальмітинової кислоти, кампестерол, стігмастерол, α-амірин) [223] і таким чином здатні пригнічувати процеси глікозилювання, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету. Відомо, що кінцеві продукти глікозилювання індукують процес полімеризації актину [36].

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 (фітол [48], естер пальмітинової кислоти [135], α-амірин [134], похідні хіназоліну [151, 208]) антиоксидантними (флавоноїди [186], вітамін Е [76], жирні кислоти [135], фітол [196], сквален [77]), протизапальними властивостями (флавоноїди [6], метиловий естер ліноленової кислоти [167], α- амірин [142]) та антиапоптичними властивостями [метиловий естер ліноленової кислоти[224], лоліолід [165]).

На рис. 4.1. наведено узагальнюючу схему молекулярних механізмів дії E^{ps} за ЕЦД, на якій зазначено можливі мішені впливу компонентів цього екстракту.

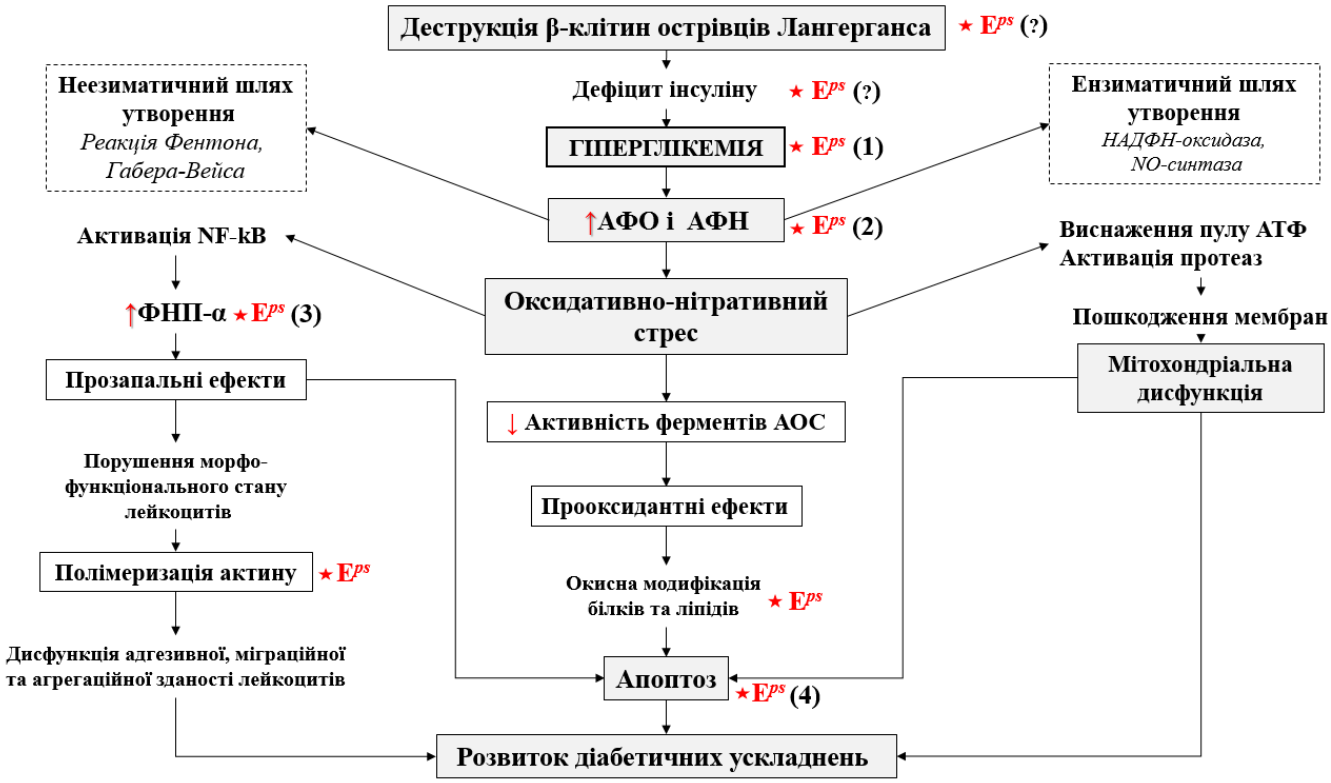

Рис. 4.1. Узагальнююча схема молекулярних механізмів дії E^{ps} за ЕЦД (червоні позначення вказують на гіпотетичні мішені впливу біологічно активних компонентів досліджуваного екстракту). Діючі компоненти екстракту: (1) – фітол, естер пальмітинової кислоти, α-амірин, похідні хіназоліну; (2) – флавоноїди, 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 цукрознижувальна 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 шляхом скавенджерування вільних радикалів та запобігання інгібування ключових компонентів ензиматичної ланки АОС.

Зміна решти досліджуваних показників при діабеті у відповідь на введення E^{ps} є опосередкована його цукрознижувальною та антиоксидантною дією, та/або може бути може бути зумовлена протизапальними та антиапоптичними властивостями його компонентів. До таких належать: апоптотичні зміни в лейкоцитах (співвідношення про- та антиапоптотичних білків (p53 і Bcl-2) та кількості клітин з ранніми та пізніми ознаками апоптозу), показники проліферативної активності клітин-попередників лейкоцитів, вміст ФНП-α та процес полімеризації актину.

На основі вищенаведених даних можна стверджувати, що фізіологічна дія E^{ps} є поліфункціональною. Вона вигідно відрізняється від механізмів дії інших екстрактів лікарських рослин з антидіабетичною дією. Отримані цукрознижувальні препарати на основі БФЕГЛ можуть бути перспективними не лише при лікуванні хворих на цукровий діабет 2-го, а й 1-го типу зважаючи на можливість відновлення β -клітин острівців Лангерганса, що є особливо актуальним.

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 Eps 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Advani A. Increasing neutrophil F-actin corrects CD11b exposure in Type 2 diabetes / A. Advani, S. Marshall, T. Thomas // Eur. J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 34, № 5. – P. 358 – 364.
2. Alba-Loureiro T.C. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus / T.C. Alba-Loureiro, C.D. Munhoz, J.O. Martins [et al.] // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2007 – Vol. 40. – P. 1037–1044.
3. Anurakkun N. J. α-Glucosidase inhibitors from Devil tree (Alstonia scholaris) / N.J. Anurakkun, M.R. Bhandari // J. Food Chem. – 2007 – Vol. 103. – P. 1319–23.
4. Armoni M. Peroxisome proliferator-activated receptorgamma represses GLUT4 promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect / M. Armoni, N. Kritz, C. Harel, F. Bar-Yoseph, H. Chen, M.J. Quon, E. Karnieli // J. Biol. Chem. – 2003 – Vol. 278. – P. 30614–30623.
5. Ashok K. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects /Ashok K. Tiwari, J. Madhusudana Rao // Current science. – 2002 – Vol. 83, № 1. – P. 30–38.
6. Aslan M. Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes / M. Aslan, N. Orhan, D.D. Orhan, F. Ergun // J .Ethnopharmacol. – 2010 – Vol.128, № 2. P. 384–389.
7. Atalay V. Altered antioxidant enzyme defenses in insulin-dependent diabetic men with increased restingand exercise-induced oxidative stress / V. Atalay, D.E. Laaksonen, L. Niskanen // Acta. Phisiol. Scand. – 1997. – 161. – P. 195 – 201.
8. Atanasov A.G. Honokiol: a nonadipogenic PPARγ agonist from nature / A.G. Atanasov, J.N. Wang, S.P. Gu, J. Bu, M.P. Kramer, L. Baumgartner, N. Fakhrudin, A. Ladurner, C. Malainer, A. Vuorinen, S.M. Noha, S. Schwaiger, J.M. Rollinger, D. Schuster, H. Stuppner, V.M. Dirsch, E.H. Heiss // Biochim. Biophys. Acta. – 2013 – Vol. 1830. – P. 4813–4819.

9. Atanasov A.T. Antiplatelet aggregation activity of a fraction isolated from Galega officinalis L. / A.T. Atanasov, B. Tchorbanov // Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. – 2003. – Vol. 10(2). – P. 63–71.
10. Baley J.C. Metformin / J.C. Baley, R. Turner // The new England journal of medicine. – 1996. – Vol. 334. – P.574–579.
11. Ballestrem C. Actin dynamics in living mammalian cells / C. Ballestrem, B. Wehrle-Haller, B. Imhof // Journal of Cell Science. – 1998 – Vol. 111. – P. 1649–1658.
12. Ban L. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism / L. Ban, J. Zhang, L. Wang // The National Acad. of Scien. – 2008 – V. 105, № 36. – P. 13644—13649.
13. Banat I. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010 – Vol. 87. – P. 427–444.
14. Barger G. Galuteolin, a new glucoside from Galega officinalis. / G. Barger, F.D. White // Department of medical chemistry. – 1923. – P.836–838.
15. Bennett C. M. HbA(1c) as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review / C. M. Bennett, M. Guo, S. C. Dharmage // Diabet. Med. – 2007. – № 24(4). – P. 333–343.
16. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow, with special reference to factors which influence and modify sedimentation properties of hematopoietic cells / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21(Suppl.) – P. 1–109.
17. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction / M. Brownlee // J. Clin. Invest. – 2003– Vol. 112, № 12. – P. 1788–1790.
18. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // Nature. – 2001. – Vol. 414, № 6865. – P. 813–820.
19. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism / M. Brownlee // Diabetes. – 2005. – Vol. 54(6). – P.1615–1625.

20. Bugyi B. Control of actin filament treadmilling in cell motility / B. Bugyi, M.F. Carlier // Annu. Rev. Biophys. – 2010 – Vol. 39. – P. 449–470.
21. Burns S.O. A congenital activating mutant of WASp causes altered plasma membrane topography and adhesion under flow in lymphocytes / S.O. Burns, D.J. Killock, D.A. Moulding , J. Metelo, J. Nunes, R.R. Taylor, A. Forge [et al.] // Blood. – 2010 – Vol. 115. P. 5355–5365.
22. Buse M.G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status / M.G. Buse // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2006 – Vol. 290, №1. – P. 1–8.
23. Butler A.E. Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis / A.E. Butler, R. Galasso, J.J. Meier [et al.] // Diabetologia. – 2007 – Vol. 50. – P. 2323–2331.
24. Campos K.E. Hypoglycemic and antioxidant effects of onion, Allium cepa: dietary onion addition, antioxidant activity and hypoglycemic effects on diabetic rats / K.E. Campos, Y.E. Diniz, A.C. Cataneo, L.A. Faine, M.J.Q.F. Alves, E.L.B. Novelli // Int. J. Food Sci. Nutr. – 2003 – Vol. 54, № 3. – P. 241–246.
25. Cantley L. The phosphoinositide 3-kinase pathway / L. Cantley // Science. – 2002. – 296.–P. 1655–1657.
26. Carlier M. Actin-based motility: cellular, molecular and physical aspects / M. Carlier // Springer. – 2010. – 97. – P. 121.
27. Carpenter C. Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1 / C. Carpenter, K. Tolias, A. Van Vugt, J. Hartwig // Adv. Enzyme Regul.– 1999. – 39. –P. 299–312.
28. Carver J.D. Postnatal inositol levels in preterm infants / J.D. Carver, C.I. Stromquist, V.I. Benford [et al.] // J. Perinatol. – 1997 – Vol. 17. P. 389-392.
29. Castellano E. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase / E. Castellano, J. Downward // Curr.topics in microbial.and immunol.– 2010. – 346. – P. 143–169.

30. Champavier Y. Acetylated and non-acetylated flavonol triglycosides from Galega officinalis / Y. Champavier, D.P. Allais, A.J. Chulia, M. Kaoudli // Chem. Pharm. Bull. – 2000. – Vol. 48(2). – P. 281—282.
31. Chang-Chen K.J. Beta-cell failure as a complication of diabetes / K.J. Chang-Chen, R. Mullur, E. Bernal-Mizrachi // Rev. Endocr Metab. Disord. – 2008. – Vol. 9. – P. 329–343.
32. Charest P.G. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement / P.G. Charest, R.A. Firtel // Biochem. J. – 2007 – Vol. 401. – P. 377–390.
33. Chemler J.A. Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion / J.A. Chemler, L.T. Lock, M.A. Koffas, E.S. Tzanakakis // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011 – Vol. 77. – P. 797–807.
34. Cnop M. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities / M. Cnop, N. Welsh, J.C. Jonas [et al.] // Diabetes. – 2005. – Vol. 54 (Suppl 2). – P. 97–107.
35. Cohen J.J. Apoptosis: physiologic cell death / J.J. Cohen, R.C. Duke, V.A. Fadok [et al.] // J. Clin. Lab. Med. – 1994. – Vol. 124. – P. 761–765.
36. Collison K.S. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs) / K.S. Collison, R.S. Parhar, B.F. Meyer, A.A. Kwaasi, M.M. Hammami, A.M. Schmidt, F.A. Al-Mohanna // J. Leukoc. Biol. – 2002. – Vol. 71, № 3. – P. 433–444.
37. Dahlgren C. Respiratory burst in human neutrophils / C. Dahlgren, A. Karlsson // J. Immunol. met. – 1999 – V. 232. – P. 3–14.
38. Das B. In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: implications in cancer chemotherapy / B. Das, H. Yeger, H. Baruchel, M.H. Freedman, G. Koren, S. Baruchel // Eur. J. Cancer – 2003. – 39. – P. 2556–2565.
39. Dawson J.A Microtiter–Plate Assay of Human NOS Isoforms / J. Dawson, R.G. Knowles // Methods in Molecular biology. – 1998. – Vol. 100. – P. 237–242.

40. de Menezes Patrício Santos C.C. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models / C.C. de Menezes Patrício Santos, M.S. Salvadori, V.G. Mota, L.M. Costa, A.A.C. de Almeida, G.A. Lopes de Oliveira, J.P. Costa, D.P. de Sousa, R.M. de Freitas, R.N. de Almeida // Neurosci. J. – 2013; – Vol. 2013 – P. 1– 9.
41. Dey L. Alternative Therapies for Type 2 Diabetes / L. Dey, M.D. Anoja, S.Attele // Alternative Medicinal review. – 2002 – Vol. 7. – P. 56–57.,
42. Diaz C. Role of translocations of the generation of phosphatidylserine assymmetry / C. Diaz, A.J. Schroit // J. Membr. Biol. – 1996. – Vol. 151, № 1. – P. 1–9.
43. Drel V.R. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats / V.R. Drel, N. Sybirna // Cell. Biol. Int. – 2010. – Vol. 34. – P. 1147–1153.
44. Drews G. Oxidative stress and beta-cell dysfunction / G. Drews, P. Krippeit-Drews, M. Dufer // Pflugers. Arch. – 2010 – Vol. 460, №4. – P. 703 – 718.
45. Drummond G.R. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets / G.R. Drummond, S. Selemidis, K.K. Griendling, C.G. Sobey // Nat. Rev. Drug Discov. – 2011 – Vol. 10, №6. – P. 453–471.
46. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases / K. Eguchi // Internal. Medicine. – 2001. – Vol. 40. – P. 275–284.
47. Eidi M. Effect of coriander seed (Coriandrum sativum L.) ethanol extract on insulin release from pancreatic beta cells in streptozotocin-induced diabetic rats / M. Eidi, A. Eidi, A. Saeidi, S. Molanaei, A. Sadeghipour, M. Bahar, K. Bahar // Phytother Res. – 2009 – Vol. 23, № 3. – P. 404–406.
48. Elmazar M. Phytol/phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations / M. Elmazar, H.S. El-Abhar, M.F.Schaalan, N.A. Farag // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, №1. – P. 1–10.
49. Estevez M. Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds / M.

Estevez, P. Kylli, E. Puolanne, R. Kivikari, M. Heinonen // J. Agric. Food. Chem. – 2008. – 56, № 22. – P. 10933–10940.

50. Evans J.L. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux, G.M. Grodsky // Endocr. Rev. – 2002. – Vol. 23, № 5. – P. 599 – 622.
51. Farias V. Chronic treatment with D-chiro-inositol prevents autonomic and somatic neuropathy in STZ-induced diabetic mice / V. Farias, F. Macedo, M. Oquendo [et al.] // Diabetes. Obes. Metab. – 2011 – Vol. 13. – P. 243–250.
52. Fu Z. Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic beta-cells / Z. Fu, D. Liu // Eur. J. Pharmacol. – 2009 – Vol. 616. – P. 321–327.
53. Fukunaga T. Studies on the constituens of Goat's Rue (Galega officinalis L.) / T. Fukunaga, K. Nishiya, K. Takeya, H. Itokawa // Chem. Pharm. Bull. – 1987. – Vol. 35(4). – P. 1610–1614.
54. Funamoto S. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI3-kinase and PTEN mediates chemotaxis / S. Funamoto, R. Meili, S. Lee, L. Parry, R.A. Firtel // Cell. – 2002 – Vol. 109. – P. 611–623.
55. Funke I. Effect of different phenolic compounds on α-amylase activity: screening by microplate-reader based kinetic assay / I. Funke, M.F. Melzig // Pharmazie. – 2005. – Vol. 60. – P. 796–797.
56. Funke I. Traditionally used plants in diabetes therapy – phytotherapeutics as inhibitors of α-amylase activity / I. Funke, M.F. Melzig // Brazilian journal of pharmacognosia. – 2006 – Vol.16, № 1. – P. 1-5.
57. Gehrmann W. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β-cells / W. Gehrmann, M. Elsner, S. Lenzen // Diabetes Obes. Metab. – 2010. – 2. – P. 149–158.
58. Gelfman M.I. Colloid Chemistry: Textbook for Universities / M.I. Gelfman, O.V. Kovalevich, V.P. Yustratov // Publishing House "Lan". – 2008 – P. 336.

59. Georgiou G. Surface-active compounds from microorganisms / G. Georgiou, S.C. Lin, M.M. Sharma // Biol. Technol. – 1992. – Vol. 10 – P. 60-65.
60. Geraldes P. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Geraldes, G.L. King // Circ. Res. – 2010 – Vol. 106, №8. – P. 1319–1331.
61. Ghitescu L. Actin and annexins I and II are among the main endothelial plasmalemma-associated proteins forming early glucose adducts in experimental diabetes / L. Ghitescu, A. Gugliucci, F. Dumas // Diabetes. – 2001. – 50, № 7. – P. 1666–1674.
62. Giacco F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // Circ. Res. – 2010 – Vol. 107, № 9. – P. 1058–1070.
63. Giammarioli A. M. GD3 glycosphingolipid contributes to Fas-mediated apoptosis via association with ezrin cytoskeletal protein / A.M. Giammarioli, T. Garofalo, M. Sorice [et al.] // FEBS Lett. – 2001 – Vol. 506. – P. 45–50
64. Gillespie K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention / K.M. Gillespie // Can. Med. Assoc. J. – 2006. – 175, N 2. – P. 165–170.
65. Giordano C. Defective expression of the apoptosiss-inducing CD95 (Fas/APO-1) molecule on T- and B-cells in IDDM / C. Giordano, R. De Maria, G. Stassi [et al.] // Diabetologia. – 1995. – Vol. 38. – P. 1449–1454.
66. Gomes A. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species / A. Gomes, E. Fernandes, L.F.C. José // Lima Journal: Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 2005 – Vol. 65, № 2-3. – P. – 45.
67. Gray A. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant Coriandrum sativum (coriander) / A. Gray, P.R. Flatt // Br. J. Nutr. – 1999 – Vol. 81, № 3. – P. 203–209.
68. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward / B. Halliwell // J. Biochem. – 2007 – Vol. 401. – P. 1–11.

69. Hanhineva K. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism / K. Hanhineva, R. Törrönen, I. Bondia-Pons, J. Pekkinen, M. Kolehmainen, H. Mykkänen, K. Poutanen // Int. J. Mol. Sci. – 2010 –, Vol. 11. – P. 1365–1402.
70. Hannigan M. Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal reorganization in murine neutrophils *in vitro* / M. Hannigan, L. Zhan, Y. Ai, C.-K. Huang // J. of Leukocyte Biology. – 2001. – 69. – P. 497–504.
71. Hi Bahl Lee Reactive Oxygen Species and Diabetic Nephropathy / Hi Bahl Lee, Hunjoo Ha, George L. King // J. Am. Soc. Nephrol. – 2003 – Vol. 14. – P 209–210.
72. Hole P.S. Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells / P.S. Hole, L. Pearn, A.J. Tonks, P.E. James, A.K. Burnett, R.L. Darley, A. Tonks // Blood. – Vol. 115, № 6. – P. 1238–1246.
73. Ilyin A.V. Glycated Haemoglobin (HbA1c) as a key parameter for monitoring patients with diabetes. Optimal organization of research / A.V. Ilyin, M.I. Arbuzov, A.P. Knyazev // Diabetes Mellitus. – 2008 – Vol. 2. – P. 60–64.
74. Kashiwagi A. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity. Glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. / A. Kashiwagi, T. Asahina, Y. Nishio [et al.] // Diabetes. – 1996 – Vol. 45. – P. 84–86.
75. Kataoka K. MafA Is a Glucose-regulated and Pancreatic beta-Cell-specific Transcriptional Activator for the Insulin Gene / K. Kataoka, S.-I. Han, S. Shioda // J. Biol. Chem. – 2002 – Vol. 277. – P. 49903–49910.
76. Keegan A. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta / A. Keegan, H. Walbank, M.A. Cotter, N.E. Cameron // Diabetologia. – 1995. – Vol. 38(12). – P. 1475-1478.
77. Kelly G.S. Squalene and its potential clinical uses / G.S. Kelly // Altern Med Rev. – 1999. – Vol. 4(1). – P. 29-36.
78. Khopyak N. Toxicologyhygiene and ecological assessments of the complex ecological sorbent glauconicolit modified by surfactant “policom” – bioreagent of ps.

species 17 (BIOPAR PS_17) / N. Khopyak // Environment & Health. – 2011 – Vol. 3. – P. 48–53.

79. Kislinger T. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression // T. Kislinger, C. Fu, B. Huber, [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999 – Vol. 274. – P. 31740–31749.
80. Kjoller L. Signaling to Rho GTPases / L. Kjoller, A. Hall // Exp. Cell. Res. – 1999 – Vol. 253. – P. 166–179.
81. Kleveta G. LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility / G. Kleveta, K. Borzecka, M. Zdioruk [et al.] // J. of Cellular Biochemistry. – 2012. – 113. – P. 80 – 92.
82. Krishnamachari V. Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: a unified mechanism for quercetin radical scavenging / V. Krishnamachari 1, L.H. Levine, P.W. Paré // J. Agric. Food. Chem. – 2002 – Vol. 50, №15. – P. 4357–4363.
83. Kroncke K. Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide / K. Kroncke, H. Brenner, M.L. Rodriguez, K. Etzkorn, H. Kolb, V. Kolbbachofen // Biochim. et biophys. acta. – 1993 – V. 1182. – P. 221.
84. Kumari K. Antidiabetic and antioxidant effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from onions (Allium cepa Linn) as compared to standard drugs in alloxan diabetic rats / K. Kumari, K.T. Augusti // Indian J. Exp. Biol. – 2002 – Vol. 40, № 9. – P. 1005–1009.
85. Kwiatkowska K. Engagement of spectrin and actin capping of FcγRII revealed by studies on permeabilized U937 cells / K. Kwiatkowska, A. Sobota // Biochem. and biophys. research communications. – 1999. – 259, № 2. P. 287 – 293.
86. Kwiatkowska K. Phosphorylation of FcgRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: The role of membrane rafts / K. Kwiatkowska, J. Frey, A. Sobota // J. Cell Sci. – 2003. – 116. – P. 537 – 550.

87. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–684.
88. Lamhamedi-Cherradi S.E. Resistance of T-cells to apoptosis in autoimmune diabetes NOD mice is increased early in life and is associated with dysregulation of Bcl-xL / S.E. Lamhamedi-Cherradi, J.J. Luan, L. Eloy [et al.] // Diabetologia. – 1998. – Vol. 41. – P. 178–184.
89. Lee A.Y. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract / A.Y. Lee, S.S. Chung // FASEB J. – 1999. – Vol. 13. – P. 23–30.
90. Lee Y.M. A phytosterol-enriched spread improves the lipid profile of subjects with type 2 diabetes mellitus. A randomized controlled trial under free-living conditions / Y.M. Lee, B. Haastert, W. Scherbaum, H. Hauner // Eur. J. Nutr. – 2003. – Vol. 42. – P. 111–117.
91. Liepina I. Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate. //Biopolymers. – 2003. – 71. –P. 49 –70.
92. Liu D. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein Kinase pathway / D. Liu, W. Zhen, Z. Yang, J.D. Carter, H. Si, K.A. Reynold // Diabetes. – 2006 –. Vol. 55. P.1043–1050.
93. Lo H.C. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: history, current status, future perspectives, and unsolved problems (review) / H.C. Lo, S.P. Wasser // Int. J. Med. Mushrooms. – 2011 – Vol. 13. – P. 401–426.
94. Logendra S. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from Artemisia dracunculus / S. Logendra, D.M. Ribnicky, H. Yang, A. Poulev, J. Ma, E.J. Kennelly, I. Raskin // Phytochem. – 2006 – Vol. 67. – P. 1539–1546.
95. Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, №1. – P. 265–275.

96. Lui T. Activation of imidazoline I2B receptors is linked with AMP kinase pathway to increase glucose uptake in cultured C2C12 cells / T. Lui, C. Tsao, S. Huang, C. Chang, J. Cheng // Neuroscience Letters. – 2010. – Vol. 474. – P. 144–147.
97. Mae T. Peroxisome proliferator activated receptor ligands containing prenyl flavonoid, related substances, or plant extracts containing the same, and process for producing the same / T. Mae, M. Tsukagawa, M. Kitahara [et al.] // PCT. Int. Appl. – 2003; – P. 74.
98. Maiese K. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus / K. Maiese, S.D. Morhan, Z.Z. Chong // Curr. Neurovasc. Res. – 2007. – Vol. 4. – P. 63–71.
99. Marles R.J. Antidiabetic plants and their active constituents / R.J.Marles, , N.R. Farnsworth // Phytomedicine. – 1995 – Vol. 2. – P. 137–189.; Dey L. Alternative Therapies for Type 2 Diabetes / L. Dey, M.D. Anoja, S.Attele // Alternative Medicinal review. – 2002 – Vol. 7. – P. 56–57.,
100. Marselli L. Th2 cytokines have a partial, direct protective effect on the function and survival of isolated human islets exposed to combined proinflammatory and Th1 cytokines / L. Marselli, F.D. Dotta, S. Piro [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86. – P. 4974–4978.
101. Martineau L.C. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry Vaccinium angustifolium Ait / L.C. Martineau, A. Couture, D. Spoor, A. Benhaddou-Andaloussi, C. Harris, B. Meddah, C. Leduc, A. Burt, T. Vuong, P. Mai Le, M. Prentki, S.A. Bennett, J.T. Arnason, P.S. Haddad // Phytomedicine. – 2006. – Vol. 13. – P. 612–623.
102. Meier J.J. Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? / J.J.Meier // Diabetologia. – 2008 – Vol. 51, № 5. – P. 703–713.
103. Miranda K.M. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite / K. M. Miranda, M. G. Espey, D. A. Wink // Nitric Oxide: Biol. and Chem. – 2001. – Vol. 5, № 1. – P. 62–71.

104. Mohazzab K.M. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium / K.M. Mohazzab, P.M. Kaminski, M.S. Wolin // Am. J. Physiol. – 1994 – Vol. 266. – P. 2568–2572.
105. Morgan M.J. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling / M. J. Morgan, Z. Liu // Cell. Research. – 2011 – Vol. 21. – P. 103–115.
106. Mukherjee R. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists / R. Mukherjee, L. Jow, G.E. Croston, J.R. Paterniti // J.Biol. Chem. – 1997 – Vol. 272, № 12. – P. 8071–8076.
107. Mullins R.D. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures / R.D. Mullins // Curr.Op.Cell Biol. – 2000. –12. – P. 91–96.
108. Nagashima K. Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus / K. Nagashima, C. Lopez, D. Donovan, C. Ngai, N. Fontanez, A. Bensadoun, J. Fruchart-Najib, S. Holleran, J.S. Cohn, R. Ramakrishnan, H.N. Ginsberg // J. Clin. Invest. – 2005 – Vol. 115. – P. 1323–1332.
109. Nagata S. Apoptosis by death factor / S. Nagata // Cell. – 1997. – Vol. 88. – P. 355–365.
110. Negi G. Concurrent targeting of nitrosative stress-PARP pathway corrects functional, behavioral and biochemical deficits in experimental diabetic neuropathy / G. Negi, A. Kumar, S.S. Sharma // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – Vol. 391, № 1. – P. 102–106.
111. Nelson R.W. The role of fiber in managing diabetes mellitus / R.W. Nelson // Vet. Med. – 1989 – Vol. 84. – P. 1156–1160.
112. Nile S.H. Antioxidant, α-glucosidase and xanthine oxidase inhibitory activity of bioactive compounds from maize (Zea mays L.) / S.H. Nile, S.W. Park // Chem. Biol. Drug. Des. – 2014 – Vol. 83, № 1. – P.119–125.

113. Olbrot M. Identification of betacell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA / M. Olbrot, J. Rud, L.G.Moss, A. Sharma // Proc. Natl. Acad. Sc. – 2002 – Vol. 99. – P. 6737–6742.
114. Omi T. Identification and characterization of novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) transcriptional variants in pig and human / T. Omi, B. Brenig, S. Spilar Kramer, S. Iwamoto, G. Stranzinger, S. Neuenschwander // J. Anim. Breed. Genet. – 2005 – Vol. 122. – P.: 45–53.
115. Oteiza P.I. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? / P.I. Oteiza, A.G. Erlejman, S.V. Verstraeten, C.L. Keen, C.G. Fraga // Clinical & Developmental Immunology. – 2005. – Vol. 12(1). – P. 19–25.
116. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87(1). – P. 315–424.
117. Paolisso G. Cardiovascular risk in type 2 diabetics and pharmacological regulation of mealtime glucose excursions / G. Paolisso, M. Rizzo, M. Barbieri // Diabetes. Metab. – 2003 –Vol. 29. – P. 335–340.
118. Patel D.K. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property / D.K. Patel, S.K. Prasad, R. Kumar, S. Hemalatha //Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2012 – P. 320–330.
119. Pereira M.A. Inhibition of Leukocyte Chemotaxis by Factor in Alloxan-lnduced Diabetic Rat Plasma / M.A. Pereira P. Sannomiya, J.G. Leme // Diabetes. -1987. – Vol. 36(11). – P. 1307-1314.
120. Pirog T.P. Microbial surfactants. Glycolipids / T.P. Pirog, A.D. Konon // Biotechnologia Acta. – 2014. – Vol. 7, № 1. P. 9–30.
121. Pirot P. Mediators and mechanisms of pancreatic β-cell death in type 1 diabetes / P. Pirot, A.K.Cardozo, D.L. Eizirik // Arq. Bras. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 52. – P. 156–165.
122. Pollard T.D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins / T.D. Pollard //Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct. – 2007 – Vol. 36. P. 451–477.

123. Rabinovitch A. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes / A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon // Cell Biochem Biophys. – 2007 – Vol. 482, № 3. – P. 159—163
124. Ram V.J. Synthesis and antihyperglycemic activity of suitably functionalized 3H-quinazolin-4-ones / V.J. Ram, B. Tripathi, A. Srivastava // Bioorg. Med. Chem. – 2003 – Vol. 11. – P. 2439–2444.
125. Ramana K.V. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells / K.V.Ramana, B. Friedrich, R. Tammali, M.B. West, A. Bhatnagar, S.K. Srivastava // Diabetes. – 2005 – Vol. 54. – P. 818–829.
126. Ren J. Anti-inflammatory Effect of α-Linolenic Acid and Its Mode of Action through the Inhibition of Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression via NF-κB and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways / J. Ren, H. Sung Chung // J. Agric. Food Chem. – 2007 – Vol. 55, № 13. P. 5073–5080
127. Ridley A.J. Cell migration: integrating signals from front to back / A.J. Ridley, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, A.R. Horwitz // Science. – 2003 – Vol. 302. – P. 1704–1709.
128. Robertson R.R. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations / R.R. Robertson, H.J. Zhang // J. Clinic. Invest. – 1996 – Vol. 97. – P. 1041–1046.
129. Rodriguez-Leyva D. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alphalinolenic acid / D. Rodriguez-Leyva, C.M.C. Bassett, R. McCullough [et al.] // Can. J. Cardiol. – 2010 – Vol. 26, № 9. – P. 489–496.
130. Rosenberg D.E. Insulin resistance, diabetes and cardiovascular risk: approaches to treatment / D.E. Rosenberg, S.A. Jabbour, B.J. Goldstein // Diabetes Obes. Metab. – 2005. – 7. – P. 642–653.
131. Salganik R.I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population / R.I. Salganik // J. Am. Coll. Nutr. – 2001 – Vol. 20 (5 Suppl). – P. 464–475.

132. Salihu A. An investigation for potential development on biosurfactants / A. Salihu, L. Abdulkadir, M. Almustapha // Biotechnology and Molecular Biology. – 2009 – Vol. 3, № 5. – P. 111–117.
133. Samstag Y. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration / Y. Samstag, S.M. Eibert, M. Klemke, G. Wabnitz // J. of Leukocyte Biology. – 2003. – 73. – P. 30 – 48.
134. Santos F.A. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α, β-amyrin, a triterpenoid mixture from Protium heptaphyllum in mice / F.A. Santos, J.T. Frota, B.R. Arruda // Lipids in Health and Disease. – 2012. – Vol. 11, № 98. – P. 1–8.
135. Sarkodie J.A. Antihyperglycaemic activity of ethanolic extract of the stem of *Adenia lobata* Engl. (Passifloraceae) / J.A. Sarkodie, T.C. Fleischer, D.A. Edoh // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2013. – Vol. 4, № 4. – P. 1370–1377.
136. Schneider-Brachert W. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles / W. Schneider-Brachert, V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, S. Schütze // Immunity. – 2004 – Vol. 21, № 3. – P. 415–428.
137. Schütze S. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization / S. Schütze, V. Tchikov, W. Schneider-Brachert // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2008 – Vol. 9, № 8. – P. 655—662.
138. Sheu M.L. Activation of Phosphoinositide 3-kinase in Response to High Glucose Leads to Regulation of Reactive Oxygen Species Related Nuclear Factor-κB Activation and Cyclooxygenase-2 Expression in Mesangial Cells / M.L. Sheu, F.M. Ho, K.F. Chao, M.L. Kuo, S.H. Liu // Mol. Pharmacol. – 2004. – 66. – P. 187 – 196.
139. Shurtz-Swirski R. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients / R. Shurtz-Swirski, S. Sela, G. Shapiro [et al.] // Diabetes Care. – 2001. – 24. – P. 104–110.

140. Sima A. Supplemental myo-inositol precents L-fucose-induced diabetic neuropathy / A. Sima, J. Dunlap, E. Davidson [et al.] // Diabetes. – 1997 – Vol. 46. – P. 301–306.
141. Sima C. Type 1 diabetes predisposes to enhanced gingival leukocyte margination and macromolecule extravasation in vivo / C. Sima, K. Rhourida, T.E. Van Dyke, R. Gyurko // J. Periodontal Res. – 2010. – Vol. 45(6). – P. 748-56.
142. Singh A. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects / A. Singh, J. Hamme, O. Ward // Biotechnology Advances. – 2007 – Vol. 25. – P. 99–121.
143. Sit S.T. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton / S.T. Sit, E. Manser // J. Cell. Sci. – 2011 – Vol. 124 – P. 679–683.
144. Smith M.J. Functional analysis of the combined role of the O-linked branching enzyme core 2 beta1-6-N-glucosaminyltransferase and dimerization of Pselectin glycoprotein ligand-1 in rolling on P-selectin / M.J. Smith, B.R. Smith, M.B. Lawrence, K.R. Snapp // J Biol Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 21984–91.
145. Susag L. The alkaloids of two species of Afro galega / L. Susag, S. Mathenge, M. Benn // Biochemical systematics and ecology. – 2003. – Vol. 31. – P. 645–647.
146. Suzuki R. Chemical constituents of the style of Zea mays L with glycation inhibitory activity / R. Suzuki [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2007 – Vol. 55. – P. 153–155.
147. Suzuki Y.J. Oxidants as stimulators of signal transduction / Y.J. Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian // Free Radic. Biol. Med. – 1997–Vol. 22(1-2). – P. 269–285
148. Tadera K. Inhibition of α-Glucosidase and α-Amylase by Flavonoids / K. Tadera, Y. Minami, K. Takamastu, T. Matsuoka // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 2006 – Vol. 52. – P. 149–53.
149. Takikawa M. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice / M. Takikawa, S. Inoue, F. Horio, T. Tsuda // J. Nutr. – 2010 – Vol. 40, № 3. – P. 527 – 533.

150. Tan A.S. Acute regulation of glucose transport after activation of human peripheral blood neutrophils by phorbol myristate acetate, FMLP, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / A.S. Tan, N. Ahmed, M.V. Berridge // Blood. – 1998 – Vol. 91, № 2. – P. 649–655.
151. Tanaka M. Identification of five phytosterols from Aloe vera gel as anti-diabetic compounds / M. Tanaka, E. Misawa, Y. Ito // Biol. Pharm. Bull. – 2006. – Vol. 29, №7. – P. 1418–1422.
152. Tejedo J. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells / J. Tejedo, J. C. Bernabe, R. Ramirez, F. Sobrino, F. J. Bedoya // FEBS Lett. – 1999 – Vol. 459, № 2. P. 238–243.
153. The United Nations Environment Programme. Report of the Persistent Organic Pollutants Review. − 19–23 November 2007. − Geneva. − P.–27
154. Tiedge M. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells / M. Tiedge, S. Lortz, J. Drinkgern, S. Lenzen // Diabetes. – 1997– Vol. 46, № 11. – P. 1733–1742.
155. Tonooka N. Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation / N. Tonooka, E. Oseid, J. Harmon, H. Zhou, T. Zhang, R.P. Robertson // Clin. Transplant. – 2007 – Vol. 21. – P. 767–772.
156. Tringer P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor / P. Tringer // Ann. Clin. Patol. – 1969.– Vol. 22, № 2. – P. 246–248.
157. Van Haastert P.J. Essential role of PI3-kinase and phospholipase A2 in Dictyostelium discoideum chemotaxis / P.J. Van Haastert, I. Keizer-Gunnink, A. Kortholt // J. Cell. Biol. – 2007 – Vol. 177. – P. 809–816.
158. Van Kampen E.J. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives / E. J. van Kampen, W. G. Zijlstra // Adv. Clin. Chem. – 1983. – Vol. 23. – P.199–257.
159. Velkov V.V. Glycosylated hemoglobin in diagnostics of diabetes mellitus and in assessment of its complications risk / V.V. Velkov // Laboratory Diagnostics. – 2008 – Vol. 2, № 44. – P.65–76.

160. Vermes I. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cellsusing fluorescein labeled annexin V / I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol. 184, № 1. – 39–51.
161. Vladimirov Y.A. Free radicals and cell chemiluminescence / Y.A. Vladimirov, E.V. Proskurnina // Biochemistry (Mosc). –2009 – Vol. 74, № 13. –P. 1545–1566.
162. Wajant H.Tumor necrosis factor signaling / H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich // Cell. Death. Differ. – 2003 – Vol. 10. – P. 45—65.
163. Warjeet S.L. Traditional medicinal plants of Manipur as anti-diabetics / S.L. Warjeet // J. Med. Plants. Res. – 2011 – Vol. 5 – P. 677–687.
164. Williams M.A. Quantitative methods in biology. In Practical Methods in Electron Microscopy. – 1977 – Vol. 6 – P. 48-62.
165. Yang H.H. Inhibitory effects of (-)-loliolide on cellular senescence in human dermal fibroblasts / H.H. Yang, K. Hwangbo, M.S. Zheng, J.H. Cho, J.K. Son, H.Y. Kim, S.H. Baek, H.C. Choi, S.Y. Park, J.R. Kim // Arch Pharm Res. – 2015 – Vol. 38, №5. – P. 876-884.
166. Yeh S.T. Using trapezoidal rule for the area under a curve calculation. Proceedings of the Twenty-Seventh Annual SAS / S.T. Yeh // User Group International (SUGI) Conference. – 2002 – Vol. 27. – P. 229–37.
167. Yu Y. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPARg-dependent mechanism / Y. Yu, P.H. Correll, J.P. Vanden Heuvel // Biochimica et Biophysica Acta. – 2002 – Vol. 1581. – P. 89.
168. Zeisel S.H. Antioxidants suppress apoptosis / S.H. Zeisel // J. Nutr. – 2004 –Vol. 134, № 11. – P. 3179–3180.
169. Ажунова Т.А. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства при экспериментальном диабете / Т.А. Ажунова, С.М. Николаев, А.А. Маркарян, С.В. Лемза // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т.4, №5. – Р. 55–59.

170. Балаболкин М.И. Применение глибенкламида и метформина в виде препарата комбинированного действия в лечении сахарного диабета 2-го типа / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Рус. мед. журн. – 2006. – Т. 14, № 13. – С. 977–979.
171. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудис-тых осложнений сахарного диабета и применение витаминов и микроэлемен-тов для их лечения и профилактики / М.И. Балаболкин // Реф. сборник «Но-вости науки и техники». Вып. «Клин. эндокринология». – 2006. – № 6. – С. 1–7.
172. Беркало Л.В. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва та ін. // За ред. І. П. Кайдашева. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
173. Битюцкая Л.Г. Антиоксиданты при экспериментальной гипергликемии: автореф. дис. . канд. мед. наук / Л.Г. Битюцкая. Владивосток, 2005. – 20 – с.163
174. Бродяк І.В. Вплив оксиду азоту на активацію апоптозу в імунокомпетентних клітинах крові при цукровому діабеті 1-го типу / І.В. Бродяк, М.Л. Барська, Р.Є. Манаровська, Н.О. Сибірна // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 4. – С. 79–85.
175. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптической смерти клеток / Е. Б. Владимирская // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 35–40.
176. Волошин О.І. Сучасні аспекти фітотерапії цукрового діабету/ О.І. Волошин, О.В. Глубоченко // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2010 – № 5. – С.47–54.
177. Воротников А.В. Хемотаксис: движение, направление, управление / А.В. Воротников // Успехи биологической химии. – 2011 – № 51. – С. 335–400.
178. Гоженко А.И. Механизмы хемотаксиса лейкоцитов при воспалении / А.И. Гоженко, А.А. В.П. Бабий, С.Г. Котюжинская, Н.П. Картавенко // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2006. – № 3. – С. 56-63.

179. Гриневич И.В. Влияние экспериментального сахарного диабета на экспрессию белков-регуляторов апоптоза p53 и Bcl2 в лимфоидных фолликулах селезенки / И. В. Гриневич, А. М. Камышный // Морфологія. – 2010. – Т. 4, № 4. – С. 19–23.
180. Гузик М.М. Вплив інгібіторів полі(ADP-рибозо) полімерази на деякі показники оксидативного стресу в лейкоцитах крові щурів за експериментального цукрового діабету / М.М. Гузик, К.О. Дякун, Л.В. Яніцька, Т.М. Кучмеровська // Український біохімічний журнал. - 2013. - Т. 85, № 1. - С. 62-70.
181. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. 556 с.
182. Дрель В.Р. Транспортери глюкози: передумови виникнення діабетичних ускладнень / В. Р. Дрель // Лабораторна діагностика. – 2013. – № 2. – С. 51–59.
183. Дрель В.Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу / В.Р. Дрель // Біологічні Студії. – 2010. – Т. 4(№2). – С. 141–158.
184. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5–18.
185. Зак К.П. Хемокины при сахарном диабете 1-го типа у человека (обзор литературы и собственные данные) // К.П. Зак, В.В. Попова // Укр. Мед. Часопис. – 2008. –№ 6. –С. 69–77.
186. Зенков Н.К. Окислительный стресс // Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова // М.: Наука / Интерпериодика. – 2001. – С. 343.
187. Коваленко В.М. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг. – К:. Авіцена, 2001. – 527с.
188. Ковальов В.М. Гіпоглікемічна активність флавоноїдів / В.М. Ковальов, М.Ф. Комісаренко, Л.Д. Халєєва, І.Н. Тімашева, В.І. Дихтярьов, Л.М. Сіра, Л.М. Малоштан, В.П. Хиля // Фармацевтичний журнал. – 1985. – №1. – С. 51–54.

189. Козловский В.И. Активация лейкоцитов, роль в повреждении эндотелия и развитии сердечно-сосудистой патологии / В.И. Козловский, А.В. Акулёнок // Вестник ВГМУ. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 5–13.
190. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров // СПб: СпецЛит. – 2010 – 95 с.
191. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, И.Г. Иванова, И.Г. Майорова [та ін.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
192. Кот Л. Сучасні уявлення про біохімічні механізми патогенезу інсуліннезалежного цукрового діабету / Л. Кот, О. Богданова, Л. Остапченко // Вісн. НАН України. – 2008 – № 9 – С. 18–26.
193. Кравец Е.Б. Роль цитокинов в патогенезе аутоиммунного диабета, вопросы иммуноинтервенции / Е.Б. Кравец, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко [и др.] // Бюл. сиб. медицины. – 2010 – Т. 9, № 1. – С. 76—83.
194. Лапынина Л.А. Выделение и изучение физиологически активных соединений галеги лекарственной как сырья для получения сахароснижающего препарата: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук. / Л.А. Лапынина. – Харьков, 1972.– 15с.
195. 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. – Т. 87, № 4.– С. 78 – 86.
196. 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. – Т. 9, №1. – С. 5–16.
197. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция / А.Н. Маянский // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т.6, №3. – С. 3–13.

198. Мерецький В.М. Фітотерапевтичні аспекти лікування цукрового діабету / В.М. Мерецький // Фітотерапія. Часопис. – № 1 – 2006 – С. 6–10.
199. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов // Л.: Медицина – 1969 – 422 с.
200. Мещишин І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків / І.Ф. Мещишин // Буков. мед. вісник. – 1999.– №1. – С.196–205.
201. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 124–126.
202. Муравлева Л.Е. Изучение окислительного метаболизма эритроцитов крови больных диабетической нефропатией / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов - Лучанский, Д.А. Клюев, Б.Ж. Култанов, Н.А. Танкибаева, Д.С. Кусаинова, А.М. Тулешова, Г.Т. Калиева // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – №4. – С. 14–17.
203. Никонова Т.В. Современные аспекты патогенеза сахарного диабета 1 типа / Т.В. Никонова // Сахарный диабет. – 2006 – № 3. – С. 59–64.
204. Пекарева Е.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Е. В. Пекарева, Т. В. Никонова, О. М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С.45–48.
205. Петрищев Н.Н. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом / Н.Н. Петрищев, Л.В. Васина, А.В. Луговая // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2008. – № 1. – С. 14–23.
206. Покровский В.И. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства / В.И. Покровский, Н.А. Виноградов // Терапевт. архив. – 2005. – №1. – С. 82–87.
207. Полторак В.В. Апоптоз панкреатических бета-клеток как новая мишень для инсулинотерапии больных сахарным диабетом 1 и 2 типа / В. В. Полторак, Н.

С. Красова, М. Ю. Горшунская // Проблеми ендокринної патології. – 2015. – № 1. – С. 90–102.

208. Patent application number: 20080207614 QUINAZOLINE DERIVATIVES FOR THE TREAT¬MENT AND PREVENTION OF DIABETES AND OBESITY Inventors: Nam Kyu Lee (Suwon- Si, KR) Jun Won Lee (Gunpo-Si, KR) Sukho Lee (Suwon-Si, KR) Guang-Jin Im (Ansan-Si, KR) Hye Young Han (Seoul, KR) Tae Kon Kim (Suwon-Si, KR) Yong Hyuk Kim (Suwon-Si, KR) Wie-Jong Kwak (Seoul, KR) Wie-Jong Kwak (Seoul, KR) Sang Woong Kim (Daejeon, KR) Joohun Ha (Seoul, KR) Eon Kyum Kim (Daejeon, KR) Jung Kyu Lee (Daejeon, KR) Choong Yeul Yoo (Daejeon, KR) Dae Yeon Lee (Daegu, KR) Assignees: SK Chemicals Co., Ltd. LEADGENEX INC. Industry Academic Cooperation Foundation of Kyunghee University.
209. Саприна Т.В. Особенности базальной и стимулированной секреции интерлейкинов-2 и -4 мононуклеарами крови при аутоиммунном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2010 –Т. 25, № 1. – С. 41—44.
210. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов // Руководство. — М. : Медицина – 1996 — 544 с.
211. 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.
212. Сибірна Н.О. Активація фосфатидилінозитол-3′-кіназного шляху лектиніндукованим сигналом через сіаловмісні глікопротеїни мембран лейкоцитів при цукровому діабеті 1-го типу / Н.О. Сибірна, М.І. Здіорук, І.В. Бродяк, М.Л. Барська, О.І. Вовк // Укр. біохім. журн. – 2011. – Т. 83. – № 5. – С. 22–31.
213. Сибірна Н.О. Методи дослідження системи крові / Н.О. Сибірна, В.А. Бурда, Я.П. Чайка– Львів: Видавн. центр Львів. нац. ун-ту, 2006. – 100 с.

214. Сибірна Н.О. Методи дослідження системи крові: Навчально-методичний посібник / Н.О. Сибірна, В.А. Бурда, Я.П. Чайка – Л.: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2005. – 100 с.
215. Сибірна Н.О.. Участь ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази у сприйнятті та передачі сигналів через галактозовмісні глікопротеїнові рецептори сегментоядерних лейкоцитів при цукровому діабеті 1-го типу / Н.О. Сибірна, І.В. Бродяк, М.Л. Барська, О.І. Вовк // Фізіол. журн. – 2012. – 58, № 6. – С. 9–22.
216. Смирнов В.В. Бактерии рода Pseudomonas / Смирнов В.В., Киприанова Е.А.; Отв. ред. Айзенман Б.Е. // АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. – К.: Наук. думка. – 1990. – 264 с.
217. Тимирбулатов Р.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р.А. Тимирбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
218. Токсиколого-гігієнічний паспорт біопрепарату PS (біоПАР PS). – Львів, 2004. – 11с. (Протокол експертизи Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедра гігієни та профілактичної токсикології № 01 від 27.01.2004 р.)
219. Томашевська Н.Я. Роль цитокінів у патогенезі мієлодиспластичного синдрому / Н.Я. Томашевська, Я.І. Виговська, З.В. Масляк // Онкология. – 2007 – Т. 9, № 2. – Р. 95–100.
220. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки / А. Фултон. – Москва: Мир. – 1987 – С. 120.
221. Хоружая Т.Г. Биофармация – научное направление в разработке и совершенствовании лекарственных препаратов: Учебное пособие / Т.Г. Хоружая, В.С. Чучалин // Томск: Лаборатория оперативной полиграфии СибГМУ. − 2006. − 75 с.
222. 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.

223. 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. – 62. – С. 55 – 60.
224. Хохла М.Р. Біохімічні зміни в клітинах периферичної крові щурів за умов введення екстракту *Galega officinalis* L. при цукровому діабеті 1 типу : автореф. дис. канд. біол. наук : 03.00.04 / М.Р. Хохла; Чернів. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича. – Чернівці. – 2013 – 20 с. - укр.
225. Цидендамбаев П.Б. Биологические эффекты флавоноидов / П.Б. Цидендамбаев, Б.С. Хишиктуев, С.М. Николаев // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – 6, № 52. – С. 229 – 233.
226. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте / С. Чевари, Т.Д. Андял, Д. Штиренгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
227. Чеснокова Н. Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободно-радикального окисления в условиях патологии / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова //Современные проблемы науки и образования. – 2006. – №6. – С. 21–26.