Львівський національний університет ім. Івана Франка
Міністерство освіти і науки України

Львівський національний університет ім. Івана Франка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДЗИДЗАН ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК [577:616.379-008.64]:[615.322:582.781]

ДИСЕРТАЦІЯ

АНТИДІАБЕТИЧНИЙ ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЕФЕКТИ ЕКСТРАКТІВ ПЛОДІВ ДЕРЕНУ СПРАВЖНЬОГО (*CORNUS MAS L.*) ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Спеціальність 091 – Біологія
Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ О. В. Дзидзан
Науковий керівник: Бродяк Ірина Володимирівна, кандидат біологічних наук, доцент

Львів – 2022

АНОТАЦІЯ

Дзидзан О. В. Антидіабетичний та антиоксидантний ефекти екстрактів плодів дерену справжнього (*Cornus mas L.*) за експериментального цукрового діабету – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 “Біологія” (09 – Біологія). – Львівський національний університет імені Івана Франка. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню гіпоглікемічних та антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти на моделі експериментального цукрового діабету у щурів та здатності екстрактів зменшувати негативний вплив окидативно-карбонільного стресу на функціональний стан лейкоцитів периферичної крові.

Цукровий діабет й досі залишається однією з найактуальніших медико-соціальних проблем суспільства, адже належить до 10 найпоширеніших захворювань в усьому світі і призводить до ураження багатьох систем та органів. Однією з причин розвитку серйозних ускладнень є виникнення інфекційно-запальних процесів за діабету, що обумовлено порушенням функціонування імунокомпетентних клітин крові, зокрема лейкоцитів. Серед усіх клітин організму клітини крові одні з перших зазнають безпосереднього впливу високої концентрації глюкози. Довготривала гіперглікемія зумовлює надмірне утворення активних форм оксигену (АФО), що спричиняють численні ушкодження, метаболічні зміни та розвиток оксидативного стресу.

З огляду на це, пошук препаратів, що здатні проявляти широкий спектр дії і характеризуються не лише гіпоглікемічними властивостями, але й здатні зменшувати негативний вплив оксидативного стресу є важливим у терапії цукрового діабету. За останні десятиліття, незважаючи на значний прогрес, досягнутий у дослідженні антидіабетичних препаратів, результати лікування пацієнтів все ще далекі від досконалості. Ці методи лікування мають деякі недоліки, включаючи виникнення стійкості до ліків, побічних ефектів і навіть токсичність, а також висока вартість препаратів. Тому, фітотерапія залишається одним з важливих джерел

отримання біологічно-активних компонентів для розробки антидіабетичних препаратів. Перспективною рослиною, яка поширена на території України та центральної Європи, є дерен справжній (*Cornus mas* L.). Плоди цієї рослини та препарати на їх основі здавна використовуються у народній медицині, проявляють різноманітні фармакологічні властивості, проте їхні ефекти є мало дослідженими за ЦД, зокрема їх вплив на імунокомпетентні клітини крові. Тому, отримання екстрактів плодів дерену справжнього та вивчення їх біологічних властивостей дасть змогу оцінити перспективу використання екстрактів як можливих препаратів для терапії діабету.

У результаті аналізу якісного та кількісного складу отриманих екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього виявлено 29 основних сполук з двох груп: 8 іридоїдів та 21 фенольна сполука, зокрема антоціани, фенольні кислоти та флавоноли. Водночас, встановлено, що антоціани та похідні кемпферолу були ідентифіковані виключно в екстракті червоних плодів дерену справжнього. Серед іридоїдів виділено три ізомери логанової кислоти, сверозид, логанін, секоксилоганін і два ізомери корнузиду. Виявлено, що вміст логанової кислоти у складі обох екстрактів є найвищим серед усіх ідентифікованих сполук та зокрема групи іридоїдів і тому, логанову кислоту екстрагували з жовтих плодів дерену справжнього і досліджували як окремий екстракт.

Вперше встановлено цукрознижувальний ефект екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом за введення у дозі 20 мг/кг маси тіла впродовж 14 днів, на що вказують зниження концентрації глюкози та інтегрального показника площі під глікемічними кривими. Екстракт логанової кислоти не проявляв гіпоглікемічного ефекту. Водночас, достовірне зниження рівня глікозильованого гемоглобіну виявлено лише у відповідь на введення екстракту червоних плодів дерену. Такі результати свідчать про сильніший гіпоглікемічний потенціал цього екстракту, що, ймовірно, пов’язано з наявністю в його складі сполук, відсутніх в інших екстрактах.

Досліджено здатність екстрактів плодів дерену інгібувати активність α-глюкозидази як один з можливих механізмів встановленої гіпоглікемічної дії.

Виявлено інгібувальний ефект усіх досліджуваних екстрактів плодів дерену справжнього на активність α-глюкозидази *Saccharomyces cerevisiae*. Проте встановлено, що екстракт червоних плодів виявляє найсильніші інгібувальні властивості, а здатність логанової кислоти пригнічувати активність цього ензиму була слабшою порівняно з екстрактами червоних і жовтих плодів. Водночас, доведено, що екстракти жовтих і червоних плодів проявляли змішаний, а логанова кислота – неконкурентний тип інгібування α-глюкозидази, що може пояснити різницю в ефективності впливу екстрактів на активність ензиму *in vitro* та їх гіпоглікемічний ефект *in vivo*.

З'ясовано, що екстракти плодів дерену справжнього сприяли приросту маси тіла у щурів з експериментальним ЦД. Такі результати свідчать про позитивний вплив екстрактів на метаболічні процеси в організмі. Встановлено підвищення середнього вмісту гемоглобіну в одному еритроциті за введення екстракту жовтих плодів дерену та логанової кислоти, а також зростання концентрації гемоглобіну у щурів, які отримували логанову кислоту. Також виявлено, що екстракти червоних і жовтих плодів сприяли збільшенню популяції еритроцитів із підвищеною стійкістю до кислотного гемолітика, що виражалося у зміщенні піку еритрограми вправо та зростанні часу гемолізу. Водночас, введення логанової кислоти не зумовлювало позитивних змін, а розподіл еритроцитів за віковими популяціями продемонстрував збільшення клітин зі зниженою резистентністю приблизно в 1,5 рази.

У результаті дослідження *in vitro* антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. на моделі мембран ліпосом з фосфатидилхоліну курячого яйця продемонстровано здатність обох екстрактів захищати ліпідну мембрану від вільних радикалів, індукованих хімічними та фізичними чинниками.

Досліджено також *in vivo* антиоксидантні властивості екстрактів плодів *Cornus mas* L. та вперше встановлено їх вплив на про/антиоксидантний статус лейкоцитів периферичної крові щурів за ЦД. Виявлено, що досліджувані екстракти обумовлювали зниження рівня АФО в лейкоцитах крові тварин з діабетом. Водночас, з'ясовано, що введення екстракту червоних плодів дерену сприяє

зростанню активності супероксиддисмутази та каталази, а також підвищенню активності глутатіонредуктази та вмісту відновленого глутатіону. Екстракт жовтих плодів дерену сприяв зростанню активності каталази та глутатіонпероксидази, а введення логанової кислоти тваринам із ЦД здійснювало позитивний вплив на глутатіонову ланку захисту та сприяло зростанню активності каталази.

Досліджено вплив екстрактів плодів *Cornus mas* L. на рівень перекисного окиснення ліпідів та формування кето- і альдегідопохідних модифікації білків в умовах оксидативного стресу за експериментального цукрового діабету. Виявлено зниження вмісту у плазмі крові окисно-модифікованих білків (ОМБ) нейтрального характеру за введення екстракту червоних плодів дерену та логанової кислоти та рівня ОМБ основного характеру за введення екстракту жовтих плодів дерену і логанової кислоти. В лейкоцитах крові екстракт жовтих плодів і логанова кислота позитивно впливали на обидва показники окисної модифікації білків, в той час як екстракт червоних плодів достовірно знижував лише продукти нейтрального характеру. Також встановлено, що екстракт червоних плодів дерену сприяв зниженню вмісту ТБК-активних продуктів у лейкоцитах і плазмі крові, натомість екстракт жовтих плодів і логанова кислота спричиняли зміни цього показника лише у лейкоцитах.

Виявлено зниження активності мієлопероксидази (МПО) в лейкоцитах крові щурів з діабетом та зростання активності цього ензиму в плазмі крові, що, ймовірно, пов’язано з посиленням дегрануляції лейкоцитів. Підтверджено зв’язок МПО з розвитком оксидативного стресу за діабету, що проявлялося у зростанні рівня ще одного біомаркера окисного пошкодження протеїнів – кінцевих продуктів оксидації (англ. AOPPs) в плазмі крові. З’ясовано, що екстракти червоних і жовтих плодів дерену сприяли зростанню активності МПО і рівня AOPPs у лейкоцитах, а екстракт логанової кислоти впливав лише на вміст кінцевих продуктів оксидації. Введення екстрактів червоних і жовтих плодів теж сприяло зниженню обох показників в плазмі крові, натомість логанова кислота проявляла свій ефект лише на активність МПО.

Одержані результати свідчать про перспективність використання досліджених екстрактів як компонентів антидіабетичних препаратів з антиоксидантною дією.

Досліджено ще один механізм негативного впливу високої концентрації глюкози, а саме її здатність неферментативно реагувати з білками з утворенням кінцевих продуктів глікації (англ. AGEs). Виявлено підвищення кількості AGEs у плазмі крові щурів за діабету, натомість, отримано цікаві результати, що свідчать про зниження рівня AGEs у лейкоцитах крові. Це, найімовірніше, пов'язано з порушенням поглинання глюкози лейкоцитами за цукрового діабету, що продемонстровано у наших дослідженнях. Оскільки відомо, що AGEs здатні реалізувати свій патологічний механізм дії, зокрема й посилювати оксидативний стрес, через зв'язування зі специфічними рецепторами на поверхні клітин (англ. RAGE), досліджено також кількість цих рецепторів. Встановлено достовірне зростання кількості рецепторів до AGEs на мембрані лейкоцитів і збільшення рівня розчинної форми RAGE у плазмі за діабету. Виявлено, що екстракт червоних плодів дерену справжнього проявляв найкращий ефект серед усіх досліджуваних екстрактів і сприяв зниженню рівня AGEs в плазмі крові та рецепторів до них.

Проаналізовано причини зниження активності ензимів антиоксидантного захисту та виникнення функціональних порушень у лейкоцитах за діабету. Встановлено зменшення поглинання флюоресцентно-міченого аналога глюкози лейкоцитами за експериментального цукрового діабету порівняно з контрольними показниками. Водночас виявлено зниження рівня АТФ в лейкоцитах крові щурів з діабетом. Введення екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти сприяло зростанню поглинання глюкози лейкоцитами та супутньому підвищенню рівня АТФ у цих клітинах.

Дослідження біологічних властивостей екстрактів плодів дерену справжнього дало змогу встановити, що вони здатні впливати на рівень глюкози в крові (за винятком логанової кислоти), коригувати порушення метаболізму та функціонального стану лейкоцитів крові та зменшувати прояви оксидативно-карбонільного стресу за ЦД. Отримані експериментальні дані вказують на доцільність використання досліджуваних екстрактів як складових комплексної

терапії та розробки на їх основі нових фармакологічних препаратів для корекції порушень за діабету.

Ключові слова: екстракт червоних і жовтих плодів дерену справжнього, логанова кислота, експериментальний цукровий діабет, лейкоцити, вільні радикали, антиоксидантна система захисту, маркерні показники оксидативно-карбонільного стресу, модельні ліпідні мембрани, перекисне окиснення ліпідів, AGEs, RAGEs.

SUMMARY

Dzydzan O. V. Antidiabetic and antioxidant effects of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruit extracts under experimental diabetes mellitus – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy 091 “Biology” (09 – Biology). – Ivan Franko National University of Lviv. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2021.

The dissertation is focused on the study of properties of red and yellow fruits extracts of *Cornus mas* L. and loganic acid on the experimental model of diabetes mellitus in rats and the ability of extracts to reduce the negative impact of oxidative-carbonyl stress on the functional state of peripheral blood leukocytes.

Diabetes is still one of the most pressing medical and social problems in society, as it belongs to the 10 most common diseases in the world and affects many systems and organs. Development of infectious and inflammatory processes in condition of diabetes due to dysfunction of blood cells, in particular leukocytes, is one of the reasons of serious complications. Blood cells are among the first to be directly affected by high glucose concentrations. Prolonged hyperglycemia leads to excessive formation of reactive oxygen species (ROS), which causes numerous injuries, metabolic changes and the development of oxidative stress. Considering this, the search for drugs that can exhibit a broad spectrum of action and are characterized not only by hypoglycemic properties, but also able to reduce the negative effects of oxidative stress is important in the treatment of diabetes.

In recent decades, despite significant progress in the study of antidiabetic drugs, the results of treatment of patients are still far from perfect. These treatments can cause drug resistance, side effects and even toxicity or use high-cost drugs. Therefore, phytotherapy remains one of the important sources of biologically active compounds for the development of antidiabetic drugs. A promising plant, which is widespread in Ukraine and Central Europe, is cornelian cherry (*Cornus mas* L.). The fruits of this plant and medicine based on them have long been used in folk medicine, show a variety of pharmacological properties, but their effects have been little studied in diabetes, including their effect on immunocompetent blood cells. Therefore, obtaining extracts of *Cornus mas* L. fruits and

studying their biological properties will allow us to assess the prospects of using the extracts as possible drugs for the diabetes treatment.

The qualitative and quantitative composition of red and yellow fruits extracts of *Cornus mas* L. was analyzed, 29 compounds from two main groups were found: 8 iridoids and 21 phenolic compounds, in particular anthocyanins, phenolic acids and flavonols. At the same time, it was found that anthocyanins and kaempferol derivatives were identified exclusively in the red fruit extract of cornelian cherry. Among the iridoids, three isomers of loganic acid, sweroside, loganin, secoxyloganin, and two isomers of cornuside were identified. It was found that the content of loganic acid in both extracts is the highest among all identified compounds and in particular the iridoids. Therefore, loganic acid was extracted from the yellow fruits of cornelian cherry and was studied as a separate extract. For the first time, the hypoglycemic effect of red and yellow fruit extracts of cornelian cherry was found under administration at a dose of 20 mg/kg body weight for 14 days to rats with streptozotocin-induced diabetes, evidenced by a decrease in glucose concentration and integral area under glycemic curves. Loganic acid did not improve blood glucose level. At the same time, a significant decrease in the level of glycosylated hemoglobin was found only in response to the administration of red fruit extract of cornelian cherry. These results indicate a stronger hypoglycemic potential of this extract, which is probably due to the presence of compounds not found in other extracts. The ability of *Cornus mas* L. fruit extracts to inhibit α-glucosidase as one of the possible mechanisms of established hypoglycemic action was studied. The inhibitory effect of all cornelian cherry extracts on the α-glucosidase *Saccharomyces cerevisiae* was revealed. However, red fruit extract was found to have the strongest inhibitory properties, while loganic acid ability to suppress this enzyme was weaker compared to red and yellow fruit extracts. At the same time, yellow and red fruit extracts possess mixed type and loganic acid has non-competitive type of α-glucosidase inhibition. These results may explain the difference in the extracts efficacy on enzyme activity *in vitro* and their hypoglycemic potential *in vivo*.

Extracts of cornelian cherry fruit were found to increase body weight in rats with experimental diabetes. These results indicate a positive effect of extracts on metabolic

processes in the body. An increase in the average hemoglobin content in one erythrocyte under administration of yellow fruit extract and loganic acid, as well as an increase in the concentration of hemoglobin in rats receiving loganic acid was found. It was also revealed that extracts of red and yellow fruits contributed to an increase in the population of erythrocytes with increased resistance to acid hemolytic, which was characterized by the shift of the erythrogram peak to the right and prolongation of hemolysis. At the same time, administration of loganic acid did not cause positive changes and leads to increase in cells with reduced resistance by about 1.5 times.

An *in vitro* study of the antioxidant properties of *Cornus mas* L. red and yellow fruit extracts in a model of phosphatidylcholine liposome demonstrated the ability of both extracts to protect the lipid membrane from free radicals induced by chemical and physical factors.

The *in vivo* antioxidant properties of *Cornus mas* L. fruit extracts were also studied and their effect on pro/antioxidant status of peripheral blood leukocytes of rats in diabetes was established for the first time. It was found that the studied extracts caused a decrease in the level of ROS in blood leukocytes of animals with diabetes. At the same time, it was revealed that the administration of red fruit extract leads to increase the activity of superoxide dismutase and catalase, as well as increase the activity of glutathione reductase and the content of reduced glutathione. The extract of yellow fruit contributed to the increase of catalase and glutathione peroxidase activity, and the administration of loganic acid to animals with diabetes had a positive effect on glutathione-dependent antioxidant defense and increased activity of catalase.

The effect of fruit extracts of *Cornus mas* L. on the level of lipid peroxidation and formation of carbonyl-modified proteins (oxidatively modified proteins) under conditions of oxidative stress in experimental diabetes mellitus was studied out. There was a decrease in plasma content of oxidatively modified proteins (OMB) of neutral character under red fruit extract and the level of OMB of basic character under yellow fruit extract administration. Loganic acid caused a decrease the content of both OMB in plasma. In blood leukocytes, yellow fruit extract and loganic acid had a positive effect on both indicators of OMB, while red fruit extract significantly reduced only neutral products. It

was also found that the extract of red fruit lead to reduce the content of TBA-active products in leukocytes and blood plasma, while yellow fruit extract and loganic acid caused changes in this indicator only in leukocytes.

There has established a decrease in myeloperoxidase (MPO) activity in blood leukocytes of diabetic rats and an increase in the activity of the enzyme in plasma, which is probably due to intensification of leukocyte degranulation. Relation between MPO and development of oxidative stress in diabetes, which was manifested by an increase in the level of another biomarker of oxidative damage of proteins – advanced oxidation protein products (AOPPs) in blood plasma, has been confirmed. Extracts of red and yellow fruits of *Cornus mas* L. were found to increase the activity of MPO and the level of AOPPs in leukocytes, and loganic acid affected only the content of AOPPs. It was shown that administration of extracts of red and yellow fruits also contributed to the reduction of both indicators in blood plasma, while loganic acid led only to the decrease in the activity of MPO. The obtained results indicate the prospects of using the studied extracts as components of antidiabetic drugs with antioxidant properties.

Another mechanism of the deleterious effect of high glucose level, in particular its ability to react non-enzymatically with proteins with the formation of advanced glycation end products (AGEs), has been studied. An increase for AGEs in blood plasma of rats with diabetes was found, instead, interesting results were obtained, indicating a decrease in the AGEs level in blood leukocytes. This is likely due to impaired leukocyte glucose uptake in condition of diabetes, as demonstrated in our studies. In view of the fact that AGEs are known to be able to exert their pathological mechanism of action, including intensify oxidative stress, through binding to specific cell surface receptors (RAGE), the number of these receptors has also been investigated. There was a significant increase in the number of receptors for AGEs on leukocytes membrane and the level of soluble form of RAGE in plasma in diabetes. It was found that the extract of red fruit of cornelian cherry showed the best effect among all studied extracts and led to reduce the level of AGEs in blood plasma and receptors to them.

It was analyzed the reasons for decrease in the activity of antioxidant enzymes and leukocytes' functional disorders development in condition of diabetes. A reduce uptake of

fluorescently labeled glucose analogue by leukocytes under experimental diabetes mellitus was found compared to control values. At the same time, a decrease in the level of ATP in blood leukocytes of rats with diabetes was established. Administration of cornelian cherry red and yellow fruit extracts and loganic acid contributed to the increase in glucose uptake by leukocytes and the concomitant increase in intracellular ATP levels.

Investigation of the biological properties of cornelian cherry fruit extracts have shown that they can affect blood glucose level (except for loganic acid), ameliorate metabolic disorders and functional state of white blood cells and reduce the oxidative-carbonyl stress in condition of experimental diabetes. The obtained results indicate the feasibility of using the studied extracts as part of complex therapy and creation on their basis new pharmacological drugs for the correction of disorders in diabetes.

Key words: extracts of red and yellow fruits of cornelian cherry, loganic acid, experimental diabetes mellitus, leukocytes, free radicals, antioxidant defense system, markers of oxidative-carbonyl stress, model lipid membranes, lipid peroxidation, AGEs, RAGEs.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Dzydzan, O., Bila, I., Kucharska, A. Z., Brodyak, I., & Sybirna, N. (2019). Antidiabetic effects of extracts of red and yellow fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Food & Function*, *10*(10), 6459–6472. https://doi.org/10.1039/C9FO00515C (Q1)
2. Dzydzan, O., Brodyak, I., Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A. Z., & Sybirna, N. (2020). Loganic acid, an iridoid glycoside extracted from *Cornus mas* L. fruits, reduces of carbonyl/oxidative stress biomarkers in plasma and restores antioxidant balance in leukocytes of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life*, *10*(12), 349. https://doi.org/10.3390/life10120349 (Q2)
3. Seniv, M. B., Dzydzan, O. V., Brodyak, I. V., Kucharska, A. Z., & Sybirna, N. O. (2021). Antioxidant effect of extract of yellow fruits of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in rats' leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Studia Biologica*, *15*(1), 15–26. https://doi.org/10.30970/sbi.1501.645

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Dzydzan O., Bila I., Babiy D., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Changes of blood system's indicators in the experimental diabetes mellitus under *per os* administration of extracts from cornelian cherry (*Cornus mas* L.) [Oral presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 58.
2. Brezvin Y., Bila I., Dzydzan O., Gordeichuk A., Kucharska A. Z., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Effect of loganic acid on some indicators of blood system under experimental diabetes mellitus [Oral presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 57.

3. Ukhin A., Izhytskyi V., Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Hypoglycemic effect of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts under streptozotocin induced diabetes mellitus in rats [Poster presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 81–82.
4. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 16–20). Infuence of *Cornus mas* L. extracts and loganic acid on blood erythrocytes under experimental diabetes mellitus [Poster presentation]. Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 253.
5. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, June 20–21). Effect of extract from red fruits of *Cornus mas* L. on the state of antioxidant defence system in leukocytes under experimental diabetes mellitus [Abstracts]. Eighth International Conference on "Quality and safety in food production chain", Wrocław, Poland, 32–33.
6. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2019, April 9–11). Effect of extract from yellow fruits of *Cornus mas* L. on the markers of antioxidant system in rats' blood leukocytes under conditions of streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XV International scientific conference for students and PhD students "Youth and progress of biology", dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas, Lviv, Ukraine, 40.
7. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2019, May 20–24). The Effect of the Iridoid – Loganic Acid from the *Cornus mas* L. fruits on plasma markers of oxidation stress in streptozotocin-induced diabetic rats [Oral presentation]. Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 358.
8. Дзидзан О., Бродяк І., Кухарська А., Сибірна Н. (2019, 30 вересня – 4 жовтня). Антиоксидантний ефект екстрактів з плодів дерену справжнього (*Cornus mas* L.) і логанової кислоти у плазмі крові щурів за стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету [Тези]. XII Український біохімічний конгрес,

присвяченому 165-й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна, 87–88.

9. Мороз А. Сенів М., Дзидзан О., Бродяк І., Сибірна Н. (2020, 25 березня). Зміни в лейкоцитарній формулі крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом за введення логанової кислоти та екстрактів з червоних і жовтих плодів дерену справжнього (*Cornus mas L.*) [Заочна участь]. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених: Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур, ДСЛР ІАП НААН, Лубни, Україна, 228–232.
10. Alfavitskyi O., Dzydzan O., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, April 27–29). Effect of extracts obtained from the *Cornus mas* L. fruits on the level of reactive oxygen species and oxidatively modified proteins in leukocytes under conditions of streptozotocin-induced diabetes [Oral presentation]. XVI International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 75th anniversary of the Faculty of Biology of Ivan Franko National University of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M. P. Derkach, Lviv, Ukraine, 40.
11. Kalanova S., Seniv M., Moroz A., Dzydzan O., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, April 27–29). Effect of extract of red fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on the activity of antioxidant defence enzymes in rat’s red blood cells with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XVI International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 75th anniversary of the Faculty of Biology of Ivan Franko National University of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M. P. Derkach, Lviv, Ukraine, 42.
12. Dzydzan O. Moroz A., Seniv M., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, October 1–2). Effect of iridoids and anthocyanins from the *Cornus mas* L. fruits on the antioxidant defense system in leukocytes under experimental diabetes mellitus. [Abstract]. Fifth International scientific Conference “Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology”, Dnipro, Ukraine, 95–96.

13. Dzydzan O., Chaban M., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). Glucose transport and ATP content in leukocytes under administration of *Cornus mas* L. fruit extracts to animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, Lviv, Ukraine, 55–56.
14. Dzydzan O., Kuchurka O., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). The extracts of *Cornus mas* L. fruits prevent the development of carbonyl stress in blood plasma of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, Lviv, Ukraine, 57.
15. Dzydzan O. Kalanova S., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). An *in vitro* evaluation of hypoglycaemic potential of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits’ extracts [Abstract]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, Lviv, Ukraine, 56.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система;

АФН – активні форми нітрогену;

АФО – активні форми оксигену;

МПО – мієлопероксидаза;

ОМБ – окисно модифіковані білки;

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;

СОД – супероксиддисмутаза;

СТЦ – стрептозотоцин;

ТБК – тіобарбітурова кислота;

ЦД – цукровий діабет;

ФНП-α – фактор некрозу пухлин α;

AAPH – (англ. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) – 2,2'-Азобіс(2-амідинопропан) дигідрохлорид

AGEs (англ. advanced glycation end products) – кінцеві продукти глікації;

AOPPs (англ. advanced oxidation protein products) – кінцеві продукти оксидації білків;

APC (англ. antigen-presenting cell) – антиген-презентуювальні клітини;

AUCglu (англ. area under a curve) – площа під глікемічною кривою;

CTL (англ. cytotoxic T–lymphocyte) – цитотоксичні Т–клітини (Т–клітини-кілери; $CD8^+$ Т–клітини);

GSH – відновлений глутатіон;

GSSG – окиснений глутатіон;

HbA1*c* (англ. glycated haemoglobin A1*c*) – глікозильований гемоглобін А1;

HLA (англ. human leukocyte antigen) – людський лейкоцитарний антиген;

MAPK (англ. Mitogen-activated protein kinase) – протеїнкіназа, що активується мітогенами;

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

NO (англ. nitric oxide) – нітроген(II) оксид;

PKC (англ. protein kinase C) – протеїнкіназа С;

PPARs (англ. peroxisome proliferator-activated receptors) – родина рецепторів, що активуються проліфераторами пероксисом;

RAGE (англ. receptor for advanced glycation end products) – рецептор до кінцевих продуктів глікації;

sRAGE (англ. soluble receptor for advanced glycation end products) – розчинний рецептор до кінцевих продуктів глікації;

T_h (англ. T-helper cells) –Т-клітини-хелпери ($CD4^+$ Т-клітини);

UPLC (англ. Ultra Performance Liquid Chromatography) – ультра високоефективна рідинна хроматографія

HPLC (англ. High-Performance Liquid Chromatography) – високоефективна рідинна хроматографія

ЗМІСТ

ВСТУП..... 23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 31
1.1. Етіологія та патогенез цукрового діабету..... 31
1.2. Зміни структурно-функціонального стану лейкоцитів крові за діабету..... 34
1.3. Діабетіндуковані зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу..... 36
1.3.1. Основні механізми розвитку оксидативного стресу 36
1.3.2. Маркерні показники оксидативного стресу в організмі за цукрового діабету..... 39
1.4. Сигнальні механізми AGE–RAGE в патогенезі цукрового діабету..... 43
1.4.1. Механізм формування AGEs та різновиди їх рецепторів 43
1.4.2. Роль сигнального шляху AGE–RAGE за цукрового діабету..... 48
1.5. Роль лікарських рослин у лікуванні цукрового діабету: компонентний склад та механізми дії біологічно активних сполук 50
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 55
2.1. Характеристика екстрактів плодів дерену справжнього (*Cornus mas* L.)... 55
2.2. Ідентифікація та кількісна оцінка сполук в екстрактах плодів дерену справжнього методами UPLC-qTOF-MS/MS та HPLC-PDA..... 55
2.3. Характеристика об’єктів досліджень 56
2.4. Методи дослідження біологічної активності екстрактів *Cornus mas* L. на моделі ліпідних мембран 56
2.4.1. Приготування ліпосом 56
2.4.2. Аналіз окиснення ліпосом за дії ультрафіолетового випромінювання типу B 56
2.4.3. Оцінка окиснення ліпосом за впливу хімічної сполуки AAPH..... 57
2.5. Дослідження інгібувальної здатності екстрактів плодів *Cornus mas* L. на активність α-глюкозидази..... 58
2.6. Визначення типу інгібування α-глюкозидази 59

2.7. Умови проведення досліджень на експериментальних тваринах 59
2.8. Визначення концентрації глюкози в крові глюкозооксидазним методом ... 60
2.9. Визначення толерантності клітин до глюкози 61
2.10. Визначення кількості еритроцитів 62
2.11. Визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика 62
2.12. Визначення концентрації гемоглобіну 63
2.13. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну 63
2.14. Виділення лейкоцитів з периферичної крові щурів 64
2.15. Визначення кількості лейкоцитів 64
2.16. Підрахунок лейкоцитарної формули крові 64
2.17. Флюоресцентно–мікроскопічне дослідження рівня активних форм оксигену у лейкоцитах периферичної крові щурів 65
2.18. Отримання лізатів лейкоцитів 65
2.19. Визначення концентрації білка за методом Лоурі 66
2.20. Методи визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків 66
2.20.1. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів 66
2.20.2. Визначення вмісту карбонільних груп білків 67
2.20.3. Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації білків 67
2.21. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікації білків 68
2.22. Визначення вмісту відновленого глутатіону 68
2.23. Визначення активності про- та антиоксидантних ензимів 68
2.23.1. Визначення активності супероксиддисмутази 68
2.23.2. Визначення активності каталази 69
2.23.3. Визначення активності глутатіонпероксидази 70
2.23.4. Визначення активності глутатіонредуктази 71
2.23.5. Визначення активності мієлопероксидази у лейкоцитах периферичної крові 71
2.24. Визначення рівня АТФ в лейкоцитах крові 72

2.25. Дослідження інтенсивності поглинання флюоресцентного аналога глюкози лейкоцитами 73
2.26. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі 73
2.27. Імуноблотинг протеїнів 74
2.28. Імуноцитохімічна детекція рецептора до кінцевих продуктів глікації на мембрані лейкоцитів 75
2.29. Статистична обробка результатів 76
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 77
3.1. Характеристика кількісного та якісного складу екстрактів плодів дерену справжнього 77
3.2. Гіпоглікемічний потенціал екстрактів плодів *Cornus mas* L. 84
3.2.1. Дослідження ефекту екстрактів плодів *Cornus mas* L. на показники глікемічного контролю за експериментального цукрового діабету у щурів 84
3.2.2. Інгібування активності α-глюкозидази *in vitro* як можливий механізм гіпоглікемічної дії екстрактів плодів *Cornus mas* L. 87
3.3. Вплив екстрактів плодів дерену справжнього на фізіологічні та гематологічні показники крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД 91
3.4. Антиоксидантний потенціал екстрактів плодів дерену справжнього 96
3.4.1. Харакеристика антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L., досліджених на моделі ліпідних мембран 96
3.4.2. Зміна рівня маркерних показників, що характеризують ступінь розвитку оксидативного стресу, в плазмі та лейкоцитах крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД за впливу екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти 99
3.5. Вплив екстрактів плодів дерену справжнього на рівень кінцевих продуктів глікації та рецепторів до них – експонованих на мембрані лейкоцитів (RAGE) і розчинних у плазмі (sRAGE) крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД 109

3.6. Особливості поглинання флюоресцентного аналога глюкози лейкоцитами та вміст АТФ у цих клітинах крові за введення екстрактів *Cornus mas* L. тваринам з ЦД 114
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 118
ВИСНОВКИ 136
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 138
ДОДАТОК А 170

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Актуальність теми

Цукровий діабет (ЦД) – це хронічне метаболічне захворювання багатофакторної етіології, яке належить до 10 найпоширеніших причин смертності в усьому світі. Соціальне значення цієї проблеми пов’язане з тим, що ЦД асоціюється з метаболічними розладами, розвитком численних супутніх захворювань та ранньою інвалідністю [95]. За останні десятиліття як кількість випадків, так і поширеність діабету неухильно зростають.

Метаболічні розлади на рівні цілого організму, зокрема порушення функціонального стану імунокомпетентних клітин крові призводить до активації імунних процесів і є причинами схильності хворих на ЦД до інфекційно-запальних ускладнень. Саме компоненти крові безпосередньо і першочергово зазнають впливу підвищеної концентрації глюкози. Клінічні дослідження хворих на ЦД та експериментальні дослідження щурів та мишей з діабетом продемонстрували дефекти у хемотаксисі лейкоцитів, порушення фагоцитарної й антибактеріальної активностей цих клітин [5].

Хронічна гіперглікемія є основним чинником, що ініціює розвиток мікро- та макросудинних ускладнень за діабету. За високої концентрації глюкози в крові відбувається посилене утворення вільних радикалів, зокрема активних форм оксигену (АФО). Вільні радикали індукують пошкодження ДНК, підвищення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і спричиняють модифікацію білків з подальшим розвитком оксидативного стресу.

За фізіологічних концентрацій АФО у лейкоцитах відіграють важливу біологічну роль у підвищенні стійкості організму до патогенів. Продукція АФО, як внутрішньоклітинних, так і позаклітинних, знаходиться під впорядкованим контролем системи антиоксидантного захисту, тому її нормальне функціонування є важливим для всіх клітин організму. Іншим аспектом у патогенезі дисфункції

лейкоцитів, зокрема і порушення компонентів антиоксидантного захисту за діабету, є здатність глюкози неферментативно взаємодіяти з білками або ліпідами з утворенням кінцевих продуктів глікації (англ. AGEs – advanced glycation end products) [5]. Кінцеві продукти глікації можуть формувати зшивки між макромолекулами, що спричиняє порушення структури білкових і ліпідних комплексів [82], зниження текучості мембран і змінює міграційну здатність лейкоцитів [145].

З метою попередження розвитку ускладнень за діабету важливим є нормалізація функціональної активності імунокомпетентних клітин крові. Особлива увага надається препаратам, що містять природні антиоксиданти і, таким чином, можуть запобігати надмірному утворенню АФО або виступати їх скавенджерами. Водночас, природні сполуки мають мінімум побічних ефектів і можуть використовуватися як додаткові засоби, що проявляють антидіабетичну дію.

На даний час науковці досліджують багато потенційних засобів із різними механізмами дії для лікування та попередження ускладнень ЦД. Перспективною сировиною є рослини роду *Cornus*. Ряд досліджень розкривають широкі фармакологічні властивості біологічно-активних сполук різних частин рослини виду *Cornus officinalis* (листя, плоди), включаючи гіпоглікемічні, протизапальні, імуномодулювальні та доводять здатність інгібувати надмірне утворення AGEs [91; 134; 138; 219]. Проте, на території України та центральної Європи поширений інший вид – *Cornus mas* L., ефекти якого є мало дослідженими *in vivo* за ЦД, зокрема його вплив на імунокомпетентні клітини крові.

З огляду на це, дослідження властивостей та механізму впливу екстрактів плодів *Cornus mas* L. на функціональний стан клітин крові та їх антиоксидантний статус за гіперглікемії дасть змогу оцінити перспективу використання цих екстрактів як можливих препаратів для терапії ЦД.

Мета дослідження – дослідити гіпоглікемічний та антиоксидантний ефекти екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього (*Cornus mas* L.) та їхню потенційну здатність коригувати функціональні та метаболічні зміни в лейкоцитах крові за стрептозотоцин-індукованого ЦД.

Для досягнення мети були визначені наступні завдання:

1. Провести аналіз якісного та кількісного складу екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L.
2. З'ясувати гіпоглікемічний потенціал екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти, виділеної з жовтих плодів *Cornus mas* L., і дослідити можливі механізми їх цукрознижувальної дії.
3. Виявити вплив екстрактів плодів дерену справжнього на фізіологічні та гематологічні показники крові щурів з експериментальним ЦД
4. Оцінити *in vitro* антиоксидантну активність екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього на моделі ліпідних мембран за перекисного окислення ліпідів, індукованого фізико-хімічними чинниками.
5. Встановити рівень маркерних показників, що характеризують ступінь розвитку оксидативного стресу, в плазмі та лейкоцитах крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД за впливу екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти.
6. Дослідити вплив екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього на рівень кінцевих продуктів глікації (AGEs) та рецепторів до них – експонованих на мембрані лейкоцитів (RAGE) і розчинних у плазмі (sRAGE) крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД.
7. Проаналізувати особливості поглинання глюкози та вміст АТФ у лейкоцитах за введення екстрактів плодів *Cornus mas* L. тваринам з ЦД.

Об'єкт дослідження – механізми коригуючого впливу екстрактів плодів дерену справжнього і логанової кислоти на порушення функціонального стану та енергетичне забезпечення лейкоцитів за стрептозотоцин-індукованого ЦД.

Предмет дослідження – гіпоглікемічна дія екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти, ферменти антиоксидантної системи захисту

лейкоцитів, маркерні показники оксидативно-карбонільного стресу, кінцеві продукти глікації та рецептори до них, рівень поглинання глюкози лейкоцитами крові та вміст АТФ.

Методи дослідження: клінічні (визначення загальних гематологічних показників: кількість еритроцитів, лейкоцитів, лейкоцитарна формула, концентрація гемоглобіну); біохімічні (дослідження антиоксидантних властивостей екстрактів на модельних ліпідних мембранах, визначення активності ензимів, типу інгібування альфа-глюкозидази, рівня маркерних показників оксидативного стресу в лейкоцитах та плазмі крові); сучасні методи молекулярно-клітинної біології (флюоресцентно-мікроскопічна оцінка рівня генерації АФО та поглинання клітинами флюоресцентно-міченого аналога глюкози, проведення вестерн-блот аналізу та протокової цитометрії, імуноцитохімічна детекція вмісту RAGE); статистичні (метод варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента, метод дисперсійного аналізу ANOVA).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за темою: "Біохімічні механізми розвитку, діагностики та корекції діабетіндукованого оксидативно-нітративного стресу" упродовж 2017–2019 років (номер держреєстрації 0117U001225); за темою в межах робочого часу викладачів: "Дослідження дії біологічно активних речовин природного походження з метою корекції патологій, що супроводжуються гіперглікемією" упродовж 2020–2021 років (номер державної реєстрації: 0120U101780) та позабюджетної теми в рамках Міжнародного обміну PhD студентів і викладачів, яка фінансувалася польським національним агентством з академічних обмінів (NAWA) у Вроцлавському природничому університеті.

Наукова новизна одержаних результатів

Проаналізовано компонентний склад отриманих екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та виявлено 29 сполук. Серед них ідентифіковано іридоїди, антоціани (відсутні в складі екстракту жовтих плодів), фенольні кислоти

та флавоноли (в складі екстракту жовтих плодів відсутні похідні кемпферолу). Вперше виявлено в очищених екстрактах плодів дерену справжнього два ізомери логанової кислоти, секоксилоганін і корнузид 2.

Встановлено антидіабетичну дію (зниження концентрації глюкози, глікозильованого гемоглобіну, інтегрального показника площі під глікемічними кривими) отриманих нами екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього на моделі стрептозотоцин-індукованого ЦД у щурів. Виявлено інгібувальний ефект екстрактів плодів дерену справжнього на активність α-глюкозидази *in vitro*, як можливий механізм їхньої гіпоглікемічної дії. Доведено, що екстракти жовтих і червоних плодів проявляли змішаний, а логанова кислота – неконкурентний тип інгібування α-глюкозидази.

Виявлено здатність екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. захищати ліпідну мембрану від перекисного окиснення, індукованого хімічними та фізичними чинниками на моделі ліпосом з фосфатидилхоліну курячого яйця. Досліджувані екстракти ефективніше захищають модельні ліпідні мембрани від вільних радикалів, утворених за термічного розкладання сполуки ААРН, ніж від окиснення, індукованого за впливу УФ-випромінювання типу В.

Вперше досліджено вплив екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. та логанової кислоти на про/антиоксидантний статус лейкоцитів периферичної крові щурів за ЦД. Доведено, що досліджувані екстракти пригнічують прояви оксидативного стресу за ЦД завдяки здатності компонентів, які є у їхньому складі, знижувати рівень АФО, і, таким чином, виявляють позитивний вплив на активність ключових ферментів антиоксидантної системи (АОС).

Продемонстровано порушення поглинання глюкози лейкоцитами крові за ЦД та його відновлення за введення досліджуваних екстрактів тваринам з ЦД, що свідчить про коригуючий вплив екстрактів на метаболічний та функціональний стан лейкоцитів. Водночас, виявлено, що екстракти сприяють зростанню рівня АТФ в лейкоцитах на фоні його зниження за діабету.

Досліджено рівень кінцевих продуктів глікації за ЦД як у плазмі, так і в лейкоцитах, а також рецепторів, через які ці продукти реалізують свій механізм

впливу на клітини. Встановлено, що екстракт червоних плодів знижував концентрацію мембранозв'язаних рецепторів до кінцевих продуктів глікації та їхніх розчинних у плазмі крові форм, що, разом із коригувальним впливом екстракту на вміст кінцевих продуктів глікації у плазмі крові та лейкоцитах, вказує на прояв інгібувальної дії екстракту на стрес-індуковані сигнальні шляхи.

Практичне значення отриманих результатів

Дослідження біологічних ефектів екстрактів плодів дерену справжнього дало змогу встановити, що вони виявляють антидіабетичний та антиоксидантний ефекти, здатні коригувати порушення метаболізму та функціонального стану лейкоцитів крові та зменшувати прояви оксидативно-карбонільного стресу за ЦД. Отримані експериментальні дані вказують на доцільність використання досліджуваних екстрактів як складових комплексної терапії та розробки на їх основі нових фармакологічних препаратів для корекції порушень за діабету. Представленні у дисертаційній роботі дані впроваджені у навчальний процес під час викладання спецкурсів: "Моніторинг продуктів харчування та лікарських препаратів" та "Функціональні харчові продукти та їхнє значення для здоров'я людини", які читаються на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача

Планування досліджень, аналіз та обговорення отриманих результатів, приготування рукописів статтей, а також формулювання основних положень, які виносяться на захист, і висновків дисертаційної роботи проводилося спільно з науковим керівником – к.б.н., доц. Бродяк І. В. Ідентифікація та кількісний аналіз сполук екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти здійснювались у співпраці з dr hab. inż. Алісії Кухарської, кафедри технології фруктів, овочів та рослинних харчових продуктів, факультету біотехнології та харчових наук, Вроцлавського природничого університету (Вроцлав, Польща). Дослідження *in vitro* антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. на моделі мембран ліпосом з фосфатидилхоліну курячого яйця проводилося спільно з dr. Paulina Strugała-Danak,

кафедри фізики та біофізики, Вроцлавського природничого університету. Роботу з використанням протокового цитометра BD FACScan (Becton Dickinson, USA) виконано за участі д.б.н, старшого наукового співробітника Інституту біології клітини НАН України Панчука Р. Р.; вимірювання на спектрофлюориметрі Quantech Wide Band Filter Fluorometer проводилось за допомоги к.б.н., наукового співробітника Інституту біології клітини НАН України Прокопів Т. М.; дослідження з використанням флюоресцентного мікроскопа здійснювались за участі к.б.н., старшого наукового співробітника кафедри фізіології людини і тварин Манька Б. О. Пошук та аналіз наукової літератури згідно теми дисертації, виконання основної частини експериментальної роботи, статистичне опрацювання результатів та написання дисертаційної роботи виконано безпосередньо дисертантом.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації були представлені на XIV, XV, XVI, XVII міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2018, 2019, 2020, 2021); 8-ій міжнародній конференції “Quality and safety in food production chain” (Вроцлав, Польща, 2018); III та IV регіональному науковому симпозіумі в рамках концепції “Єдине здоров’я” (Київ, 2018, 2019); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур” (Березоточа, 2020); V міжнародній науковій конференції “Сучасні проблеми біохімії, клітинної біології та фізіології” (Дніпро, 2020), а також на наукових семінарах кафедри біохімії та на щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті: 2 статті у міжнародних виданнях з квартилями Q 1–2 та 1 статтю в українському фаховому журналі, а також 15 тез доповідей на закордонних, міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, конгресах, симпозіумах.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація містить такі розділи: “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи досліджень”, “Результати досліджень”, “Аналіз та узагальнення результатів досліджень”, “Висновки” та “Список використаних джерел”. Дисертацію викладено на 173 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 25 рисунками та 6 таблицями.

Список літератури включає 251 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіологія та патогенез цукрового діабету

Цукровий діабет (ЦД) – ендокринно-обмінне захворювання, яке спричинене абсолютною чи відносною недостатністю гормону підшлункової залози – інсуліну, що пов'язано з впливом різних ендогенних (генетичних) та екзогенних чинників. Захворювання характеризується хронічним перебігом і порушенням усіх видів обміну речовин: білкового, вуглеводного, ліпідного, ураженням органів і тканин [47].

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я визначає три основні форми ЦД: діабет 1 типу (інсулінозалежний), діабет 2 типу (інсулінонезалежний) та гестаційний діабет, який виникає під час вагітності. Інші специфічні типи ЦД, що трапляються нечасто (близько 1% випадків), виникають за хронічних запалень підшлункової залози, захворювань інших ендокринних залоз, дії деяких лікарських препаратів та ін. [175]. Виділяють теж ідіопатичний ЦД 1 типу, за якого спостерігається зниження функціональної активності β-клітин з розвитком симптомів інсулінопенії, кетозу і кетоацидозу, але відсутні імунні маркери аутоімунної деструкції β-клітин [6].

Цукровий діабет 1 типу становить лише близько 10% випадків захворювань на діабет у всьому світі, проте він частіше розвивається в ранньому віці. Цей тип характеризується підвищеним рівнем глюкози в крові (гіперглікемією), що пов'язано з абсолютним дефіцитом інсуліну і виникає як наслідок аутоімунного руйнування β-клітин підшлункової залози через опосередковану Т-клітинами запальну реакцію та гуморальну (В-клітинну) відповідь [104; 106; 112].

Руйнування β-клітин може мати генетичні передумови та/або бути пов'язаним з впливом факторів навколишнього середовища [6]. Поліморфні алелі ряду локусів на різних хромосомах можуть як позитивно, так і негативно асоціюватися з розвитком ЦД 1 типу. Встановлено зв'язок між захворюванням і наявністю певних антигенів основного комплексу гістосумісності у людей (з англ. HLA – human leukocyte antigen). Поліморфні алелі комплексу HLA відповідають за 40–50% генетичного ризику розвитку діабету. Зокрема, більше 90% пацієнтів з ЦД 1 типу мають гаплотипи HLA-DR3, DQB1*0201 (відомий як DR3-DQ2) або HLA-DR4,

DQB1*0302 (DR4-DQ8). Крім того, близько 30% пацієнтів мають обидва гаплотипи (гетерозиготи DR3/4). З іншого боку, наявність деяких алелів DR4, таких як DRB1*0403 та DPB1*0402, зменшує ризик розвитку цього захворювання навіть за наявності алелю високого ризику DQB1*0302. Виявлено, що алель HLA DQB1*0602 забезпечує захист від розвитку ЦД [165; 171]. Крім HLA генотипу, генетичними маркерами теж вважають поліморфізм гена інсуліну, гена β-ланцюга Т-клітинного рецептора, гена глікопротеїну 4 цитотоксичних Т-лімфоцитів, гена, який кодує важкий ланцюг імуноглобулінів, тощо.

Екзогенні фактори можуть бути потенційними тригерами для опосередкованого імунокомпетентними клітинами руйнування β-клітин. До таких чинників належать β-тропні віруси, токсини, хімічні та цитотоксичні речовини. До цитотоксичних речовин, які провокують розвиток ЦД, належить ряд хімічних сполук – нітрозоаміни, алоксан, стрептозотоцин тощо. Вони здійснюють безпосередню деструкцію β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози. Спричинити руйнування острівцевих клітин можуть і лікарські препарати (кортикостероїди, індометацин, циметидин та ін.).

Виявлено зв’язок між ЦД 1 типу та низкою різних вірусних захворювань. Тропними до β-клітин вважають віруси Коксакі, епідемічного паротиту, краснухи, вітряної віспи, кору, гепатиту, інфекційного мононуклеозу, грипу, цитомегаловірус і деякі інші [35; 104; 165]. Ураження підшлункової залози може відбуватися внаслідок безпосередньої цитотоксичної дії вірусів на β-клітини [68]. Іншим механізмом дії вірусів є молекулярна мімікрія, за якої імунна відповідь спрямована проти аутоантигенів підшлункової залози, що нагадують антигени вірусів, і це призводить до клітинної деструкції [206; 212].

Руйнування β-клітин підшлункової залози може відбуватися за активації різних процесів: апоптозу або некрозу [165]. Порушення імунної регуляції, обумовлене генетичною сприйнятливістю та впливом екзогенних чинників, характеризується активацією клітинного та гуморального імунітету, розвивається запалення острівців підшлункової залози – інсуліт та утворюються аутоантитіла до різних компонентів клітин підшлункової залози, включаючи аутоантитіла до

антигенів острівцевих клітин, проінсуліну, інсуліну, декарбоксилази глутамінової кислоти і трансмембранного білка тирозин-фосфатази [129]. Антигенпрезентувальні клітини (АПК) поглинають аутоатигени і представляють їх Т-хелперам (Th) у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності (англ. MHC – major histocompatibility complex) класу II. Водночас, АПК вивільняють інтерлейкін-12 (ІЛ-12), що активує Th1, зумовлюючи порушення імунного балансу між ефекторними та регуляторними клітинами. Клітини Th1 продукують ІЛ-2 та інтерферон-γ (ІФ-γ), які активують макрофаги та прецитотоксичні Т-клітини, перетворюючи їх на цитотоксичні клітини (англ. CTL – cytotoxic T cells). Такі макрофаги вивільняють запальні медіатори, що здійснюють токсичну дію на β-клітини: ІЛ-1β, фактор некрозу пухлин-α (ФНП-α), ІФ-γ, а також вільні радикали. Підвищена експресія Fas і ФНП-α призводить до активації рецептор-опосередкованого механізму апоптичної загибелі β-клітин (Fas/FasL) [165].

Водночас, CTL здатні розпізнавати антигени, експоновані на β-клітинах, у поєднанні з молекулами MHC класу I і вивільняти гранзим і перфорин (цитолізин), що спричиняє руйнування цих клітин шляхом деструкції (некрозу). Таким чином, синергічна дія макрофагів, Т-клітин і цитокінів спрямована на деструкцію β-клітин, що призводить до розвитку аутоімунного діабету 1 типу [33; 140; 225].

Деструкція β-клітин протікає субклінічно як інсуліт протягом кількох місяців або років. Клінічний період хвороби виявляють у разі загибелі 80–95% функціонуючих β-клітин.

Симптоми, що супроводжують ЦД 1 типу, розвиваються на фоні дефіциту секреції інсуліну, що зумовлює порушення обміну речовин. Внаслідок нестачі інсуліну знижується поглинання глюкози інсулінзалежними тканинами та її використання. Це призводить до розвитку енергетичного дефіциту в клітинах. Глюкоза накопичується в міжклітинному просторі та в крові і виникає гіперглікемія. Для зниження дефіциту енергії в клітинах вмикається механізм посиленого глікогенолізу. З підвищенням активності глюкагону, зростає розпад глікогену в печінці і додаткове надходження глюкози в кров. Але глюкоза, яка утворилася з

глікогену, теж не проникає в клітини і сприяє ще більшому наростанню гіперглікемії [116; 247].

Для зменшення енергетичного дефіциту на рівні цілого організму активуються компенсаторні механізми: виникає поліфагія і посилюється глюконеогенез – утворення ендогенної глюкози з глюкогенних попередників білкового та ліпідного обмінів. Розпад білків супроводжується виснаженням білкових запасів організму, порушенням імунного статусу, негативним азотистим балансом, виходом із клітин резервів калію, фосфору та магнію, підвищенням продукції сечовини.

Внаслідок дефіциту інсуліну в жировій тканині стимулюється катаболізм ліпідів. Цей процес призводить до утворення великої кількості жирних кислот (ЖК), які за β-окиснення перетворюються в кетонові тіла і використовуються інсулінонезалежними тканинами для підтримання енергетичного балансу. Утворені за ЦД кетонові тіла не можуть повністю використовуватися в циклі Кребса. Рівень кетонових тіл у крові підвищується, виникає кетонурія.

За гіперглікемії та метаболічних порушень, які розвиваються у процесі прогресування ЦД, збільшується ризик розвитку мікросудинних (нефропатія, ретинопатія, нейропатія) та макросудинних (захворювання периферичних артерій, ішемічні захворювання, застійна серцева недостатність, інфаркт міокарда, інсульт) ускладнень [116]. Ускладнення, що супроводжують ЦД, є гетерогенними і мультифакторними. Важливим елементом схильності хворих на ЦД до розвитку супутніх захворювань та інфекційно-запальних процесів є зміни у структурно-функціональній активності клітин крові [244].

1.2. Зміни структурно-функціонального стану лейкоцитів крові за діабету

У хворих на ЦД часто виникають бактеріальні та грибкові інфекції, які важко піддаються лікуванню й спричиняють загальне порушення гомеостазу всіх систем. Функціональний стан лейкоцитів є одним з найважливіших факторів неспецифічної резистентності організму. Лейкоцити діють як клітини першої лінії захисту в крові, а зниження їх функціональної активності сприяє високій сприйнятливості до інфекцій та тяжкості їхнього перебігу за діабету [5]. Водночас, лейкоцити беруть

участь в ініціюванні та розвитку аутоімунного діабету та багатьох супутніх ускладнень [13; 96].

Цукровий діабет характеризується хронічним системним запаленням, яке призводить до активації лейкоцитів і рекрутування їх в різні органи. За діабету лейкоцити набувають підвищеної адгезивної здатності до ендотелію судин через збільшення експонування молекул клітинної адгезії на поверхні ендотеліальних клітин. Також спостерігається збільшення жорсткості мембрани лейкоцитів і зниження їх здатності до деформації, що, ймовірно, пов’язано зі змінами ліпідного складу мембран і зниженням їх плинності. Посилення глікації білків клітинної мембрани або внутрішньоклітинних протеїнів за гіперглікемії теж спричиняє підвищення жорсткості мембран клітин. Водночас, хронічна активація лейкоцитів, зокрема нейтрофілів, за ЦД збільшує базальний рівень F-актину цитоскелету, що призводить до змін у здатності клітин до деформації [113]. Зменшення деформації лейкоцитів разом із малим діаметром просвіту капілярів і підвищенням їх адгезії до ендотелію спричиняють захоплення цих клітин у капілярах (лейкостаз) і посилення судинної оклюзії, що є важливим чинником у розвитку діабетичних ангіопатій [13; 32].

За ЦД також виявлено зниження бактерицидної здатності та фагоцитарної активності лейкоцитів і зменшення вивільнення ними лізосомальних ферментів. Дефекти у процесі фагоцитозу у хворих на ЦД, ймовірно, пов’язані зі змінами метаболізму ліпідів, дефіцитом енергетичного забезпечення клітин і порушенням функціонування цитоскелету [32]. Оскільки для здійснення лейкоцитами їх функцій необхідна енергія, метаболічні зміни можуть бути залучені до виникнення різного роду ускладнень, які спостерігаються за діабетичних станів [5].

Окрім того, активовані лейкоцити здатні секретувати у кров різноманітні ефекторні молекули, зокрема цитокіни, хемокіни й активні форми оксигену / нітрогену (АФО/АФН), тим самим сприяючи стійкому запаленню. Прозапальні цитокіни регулюють основні анаболічні каскади, що беруть участь у передачі сигналів інсуліну, та погіршують гомеостаз глюкози. Зокрема, ФНП-α – один з цитокінів, який найчастіше секретують активовані макрофаги, має здатність

знижувати експресію важливих генів, задіяних у процесах регуляції рівня глюкози, наприклад, транспортера глюкози GLUT-4 та PPARγ (з англ. PPAR – рецептор, що активуються проліфераторами пероксисом), який задіяний у забезпеченні чутливості клітин до інсуліну [13; 221; 249]. Вивільнення лейкоцитами АФО є важливою ланкою вродженого імунітету і необхідне для забезпечення антибактеріальної здатності клітин у нормі. Проте, надмірне утворення АФО, може призводити до пошкодження ендотеліоцитів і прилеглих тканин [84], а також порушує антиоксидантний захист клітин, що й обумовлює схильність хворих на ЦД до інфекцій.

1.3. Діабетіндуковані зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу

1.3.1. Основні механізми розвитку оксидативного стресу

Безліч наукових досліджень стверджують, що “вільні радикали” й інші “реактивні сполуки” беруть участь у розвитку багатьох захворювань людини, а їх посилене утворення робить вагомий внесок у прогресування діабету та його ускладнень [124; 182].

Вільні радикали дуже нестабільні і швидко реагують з іншими сполуками, намагаючись захопити необхідний електрон для досягнення стабільності. Коли “атакована” молекула втрачає електрон, вона сама стає вільним радикалом, починаючи ланцюгову реакцію. Виділяють різні категорії цих сполук: АФО, АФН, реактивні форми хлору, реактивні карбонільні сполуки й інші [124].

За нормальних умов вільні радикали виконують важливі фізіологічні функції в організмі. Зокрема, нейтрофіли та макрофаги продукують супероксидний радикал ($O_2^{\bullet-}$) та нітроген(II) оксид (NO), що сприяють процесу фагоцитозу та залучені у знищенні бактерій. АФО беруть участь в регуляції транскрипції генів внаслідок активації різних сигнальних шляхів всередині клітини, таких як MAPK та ERK. Однак, надпродукція вільних радикалів призводить до пошкодження тканин і загибелі клітин та розвитку оксидативного стресу. Термін “оксидативний стрес” характеризує дисбаланс між утворенням АФО/АФН, з одного боку, та рівнем

молекул антиоксидантного захисту, з іншого, і є однією з основних причин розвитку ускладнень за діабету [182].

Досліджено, що за ЦД надмірне утворення АФО відбувається внаслідок гіперактивації поліолового шляху, збільшення формування AGEs та активації протеїнкінази С (PKC). Найважливішими джерелами генерації АФО є дихальний ланцюг мітохондрій, НАДФН-оксидаза, ксантиноксидаза, ліпооксигеназа, синтаза нітроген оксиду (NOS), мієлопероксидаза [202], пероксисоми. Відома роль в оксидативному стресі PPARs (α, γ та δ), які регулюють ліпідний метаболізм, глюкозний та енергетичний гомеостаз [127; 131].

Як відомо, основним первинним чинником розвитку подальших ускладнень є порушення метаболізму глюкози за ЦД. Гіперглікемія призводить до перенасичення гексокінази в тканинах, які не залежні від інсуліну (наприклад, сітківка, нирки, периферичні нерви та кровоносні судини) і тому більше 30% глюкози спрямовується у поліоловий шлях [152]. Основний фермент цього шляху, НАДФН-залежна альдозоредуктаза, каталізує відновлення глюкози до сорбітолу з подальшим окисненням сорбітолу до фруктози за допомогою $НАД^+$-залежної сорбітолдегідрогенази. Активація поліолового шляху призводить до виснаження внутрішньоклітинного НАДФН та надлишку НАДН, тобто до відновного дисбалансу. Відновлений $НАД^+$ є джерелом електронів у комплексі I електронно-транспортного ланцюга, що призводить до збільшення генерації $O_2^{\bullet-}$ в мітохондріях [11; 79].

Поліоловий шлях теж призводить до зниження біодоступності НАДФН. Відновлений $НАДФ^+$ є кофактором для NOS. Якщо ендотеліальній синтазі нітроген оксиду (eNOS) не вистачає субстрату, L-аргініну, або одного з його кофакторів, вона може утворювати $O_2^{\bullet-}$ замість NO [11].

Крім того, супероксидний радикал може реагувати з NO з утворенням пероксинітриту ($ONOO^-$), який прямо або опосередковано через продукти свого метаболізму може взаємодіяти з рядом молекул у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції. Пероксинітрит спричиняє окиснення низькомолекулярних антиоксидантів, таких як глутатіон, цистеїн і тетрагідробіоптерин, і призводить до

ПОЛ, інактивації ферментів внаслідок окиснення сульфгідрильних груп, нітрування тирозину та пошкодження ДНК [15; 67; 204]. Досліджено, що $ONOO^-$ спричиняє нітрування залишків тирозину в Т-клітинному рецепторі і корецепторі CD8, що призводить до зміни конформації їхніх поліпептидних ланцюгів, тим самим пригнічуючи специфічну відповідь $CD8^+$ Т-клітин [73].

Іншим механізмом розвитку ускладнень за ЦД є активації РКС. Постійна та надмірна активація ізоформ РКС є результатом, перш за все, посилення *de novo* синтезу діацилгліцеролу з глюкози через збільшення доступності фосфотріоз. Наявні також докази того, що взаємодія між AGEs та їх рецепторами на клітинній поверхні може призвести до активації ізоформ РКС. Протеїнкіназа С здатна впливати на активність eNOS, НАДФН-оксидази, фосфоліпази А2, регулювати судинний ендотеліальний фактор росту, трансформувальний фактор росту-β та ядерний фактор транскрипції κB (NF-κB) [11]. Високий рівень глюкози може стимулювати утворення АФО шляхом РКС-залежної активації НАДФН-оксидази. НАДФН-оксидази – це родина ферментів, вперше ідентифікованих у фагоцитах, з основною функцією генерування АФО як частини вродженої імунної відповіді на патогени [17]. Фермент каталізує перенесення електронів від НАДФН до позаклітинного молекулярного кисню з утворенням $O_2^{\bullet-}$ [109].

Ще одним місцем утворення АФО у мітохондріях є каталітичний цикл цитохрому (цитохром P450). Ферменти цього циклу здатні метаболізувати широкий спектр органічних субстратів (ліпіди, стероїдні гормони, ксенобіотики), утворюючи $O_2^{\bullet-}$ та H_2O_2 як побічні продукти. Крім того, деякі інші білки ссавців, такі як НАДН-цитохром b5 редуктаза, моноаміноксидази, дигідрооротатдегідрогеназа, комплекс II (сукцинатдегідрогеназа), теж генерують АФО в мітохондріях [194].

Циклооксигенази (ЦОГ) та ліпооксигенази (ЛОГ) беруть участь у метаболізмі поліненасичених ЖК, синтезуючи біоактивні ейкозаноїди. Ензими ЦОГ та ЛОГ окиснюють арахідонову кислоту з утворенням простагландинів G2 і H2 та гідропероксидів ЖК, що супроводжується вивільненням АФО. Пероксильні радикали ($ROO^\bullet$) та алкоксильні радикали ($RO^\bullet$) є проміжними речовинами

метаболізму гідропероксидів. Сам шлях арахідонової кислоти може бути джерелом АФО через активацію НАДФН-оксидази [194].

Вільні радикали теж є побічними продуктами реакції, що каталізується ксантиноксидоредуктазою. Фермент, переважно, є у формі дегідрогенази, але за певних стресових умов, таких як гіпоксія, переважає ізоформа оксидази. В оксидазній формі спорідненість ферменту до кисню значно підвищується, що призводить до одновалентного та двовалентного переносу електронів на молекулу O_2 з утворенням $O_2^{\bullet-}$ та H_2O_2, відповідно [202].

Активація цих механізмів за ЦД призводить до надмірного утворення АФО/АФН, що здійснюють свій токсичний вплив на клітини та клітинні компоненти і призводять до формування біомаркерів оксидативного стресу.

1.3.2. Маркерні показники оксидативного стресу в організмі за цукрового діабету

Оксидативний стрес відіграє ключову роль у патофізіології діабету та його ускладнень. Вільні радикали беруть участь у процесі руйнування β-клітин за розвитку діабету. Цікаво, що в експериментальних моделях ЦД 1 типу теж залучений процес генерування токсичної кількості АФО всередині острівців, зокрема, за дії стрептозотоцину (СТЦ) або алоксану. Стрептозотоцин проникає всередину β-клітин через GLUT-2 рецептори, інтегровані у мембрану, та спричиняє алкілування і подальшу фрагментацію β-клітинної ДНК. В клітинах запускається процес відновлення ДНК, що зумовлює активацію ферменту полі-(АДФ-рибозо)-полімерази, і призводить до виснаження клітинного пулу $НАД^+$, а згодом і АТФ. Посилений метаболізм АТФ забезпечує субстратом інший ензим – ксантиноксидазу, яка каталізує останні стадії метаболізму пуринів з утворення АФО, зокрема $O_2^{\bullet-}$ та H_2O_2. Стрептозотоцин, завдяки наявності залишку нітрозосечовини, є потенційним донором NO, який разом із $O_2^{\bullet-}$ може генерувати цитотоксичний $ONOO^-$, що пошкоджує клітини підшлункової залози. Водночас, NO здатний інактивувати мітохондріальний фермент – аконітазу, спричиняючи порушення синтезу АТФ. Алкілування ДНК та виснаження запасів енергії в клітині, в кінцевому підсумку,

призводить до некрозу β-клітин і подальшого розвитку супутніх ускладнень за ЦД [42; 62; 149; 205].

На рівні всього організму надмірне утворення АФО та АФН за гіперглікемії спричиняє окиснення клітинних білків, нуклеїнових кислот або ліпідів мембран і порушення їх структури та функцій [26]. Вільні радикали мають не лише пряму шкідливу дію, але можуть опосередковано пошкоджувати клітини, активуючи різноманітні стресочутливі внутрішньоклітинні сигнальні шляхи та метаболічні перетворення [79]. Зокрема, АФО здатні регулювати МАРК сигнальний шлях та ініціювати активацію NF-kB, ключового регулятора транскрипції генів антиоксидантних ферментів [162; 229].

За фізіологічних умов рівень утворених АФО/АФН та інших реактивних сполук знаходиться під контролем АОС. Одними з компонентів АОС є ферменти: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатіонпероксидаза (ГПО), глутатіонредуктаза (ГР), та відновлений глутатіон (GSH). Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію $O_2^{\bullet-}$ з утворенням кисню і H_2O_2. Гідроген пероксид вважається нерадикальним і слабким окисником з відносно довгим періодом напіврозпаду, який легко дифундує між клітинами і клітинними мембранами [109; 150; 173]. Більша частина утвореного H_2O_2 за участі мієлопероксидази (МПО) нейтрофілів перетворюється в гіпохлоритну кислоту (HOCl), яка є потужним окисником. Інші ферменти АОС, такі як КАТ та ензими глутатіонової ланки захисту, а також GSH беруть участь в знешкодженні H_2O_2. Глутатіон має більшу спорідненість до H_2O_2, ніж КАТ, і, таким чином, виявляє сильнішу антиоксидантну дію. Однак, коли $O_2^{\bullet-}$ продукується у високих концентрація, як за діабету, його рівень може перевищувати антиоксидантну здатність цих ферментів. У цьому разі H_2O_2 чинить цитотоксичну дію та може додатково відновлюватися до гідроксильного радикала ($^{\bullet}OH$) або у реакції Фентона за наявності іонів феруму, або у реакції Хабера–Вайса. Гідроксильний радикал є найпотужнішим із АФО і здатний безпосередньо пошкоджувати вуглеводи, ліпіди та ДНК [109]. Такі продукти стають біохімічними маркерними показниками розвитку оксидативного стресу.

До біомаркерів оксидативного стресу у хворих на ЦД належать продукти ПОЛ, такі як малоновий діальдегід (МДА) і реактивні гідропероксиди (ROOH), та окисно модифіковані білки (ОМБ), що представлені у вигляді кінцевих продуктів окиснення білків (англ. AOPPs – advanced oxidation protein products) та карбонільованих протеїнів (–C=O).

У біологічних системах ПОЛ відіграє важливу роль у розвитку запальної реакції і залучене у каскаді реакцій утворення простагландинів. Проте, надмірне ПОЛ, що розвивається за оксидативного стресу, спричиняє пошкодження клітинних мембран, ліпопротеїнів та інших молекул. Доведено, що ПОЛ може змінювати проникність і плинність мембран клітин, впливає на процес транспорту сполук через мембрану [188]. Субстратом ПОЛ є ненасичені ЖК, що входять до складу фосфоліпідів мембран клітин і визначають властивості мембран: плинність, проникність тощо [251]. Окиснення ненасичених ЖК, що опосередковується вільними радикалами, проходить три послідовні стадії [74].

I. Під час фази ініціації вільні радикали реагують з молекулою ненасиченого фосфоліпіду (RH, R – вуглеводневий радикал) з відщепленням одного атома гідрогену, що призводить до утворення ліпідних алкільних радикалів ($R^{\bullet}$):

$$RH + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O + R^{\bullet}.$$

II. Ліпідні радикали реагують з молекулами кисню, утворюючи пероксильні радикали ($ROO^{\bullet}$). Останні окиснюють нові молекули ліпідів з утворенням ліпідних гідропероксидів (ROOH), які спонтанно або за участю іонів феруму розпадаються з утворенням алкоксильних радикалів ($RO^{\bullet}$):

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet};\ ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet};\ ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + HO^{\bullet}.$$

III. Під час фази термінації пероксильні радикали можуть вступати в реакцію з іншими радикалами, утворюючи менш реакційноздатні сполуки, які блокують другу стадію окиснення ненасичених ЖК.

Ліпідні радикали ($R^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$), що утворилися, та АФО ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, HOCl) можуть вступати у реакції з молекулами білків і нуклеїнових кислот, формуючи нові радикали. Важливу роль відіграють не лише первинні (ліпідні

радикали й АФО), а й вторинні продукти вільнорадикального ПОЛ (4-гідроксиноненаль і МДА) [251].

Кількісне визначення дієнових кон'югатів і ліпідних гідропероксидів важливе під час вивчення ПОЛ і дає змогу оцінити ефективність дії сполук з антиоксидантними властивостями. Окиснення поліненасичених ЖК ініціюється за наявності металів змінної валентності (Cu^{2+}, Fe^{3+}), хімічних компонентів (наприклад, ААРН здатен ініціювати реакції окиснення як за допомогою нуклеофільних, так і вільнорадикальних механізмів), у разі нагрівання та впливу ультрафіолетового випромінювання (УФ-В, УФ-С).

Ще одним раннім індикатором ураження клітин оксидативним стресом за діабету є окисна модифікація білків. Індукторами формування ОМБ є АФО на фоні зниження активності АОС. Вільні радикали атакують білки, порушуючи не тільки вторинну та третинну, але і первинну їх структуру, що призводить до зміни або втрати функціональної активності протеїнів (каталітичної, регуляторної, транспортної, рецепторної та ін.), агрегації або фрагментації білкової молекули. Продукти, утворені за безпосереднього окиснення бічних ланцюгів амінокислотних залишків білків (так звана реакція "первинного карбонілювання білка") можуть реагувати з 2,4-динітрофенілгідразином, утворюючи гідразони, що є важливим для їх детекції [203]. Інтенсивність ОМБ визначається особливостями амінокислотного складу білків. Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з АФО, та утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні групи та аміногрупи білків. Отже, такі амінокислоти як цистеїн, треонін, лізин, пролін, аргінін і гістидин найчастіше піддаються карбонілюванню.

Карбонільовані похідні можуть утворюватися і внаслідок окисного розщеплення білків, амідування або окиснення бічних R-груп глутаміну.

Крім того, додаткові карбонільні групи можуть формуватися в білках у разі вторинної реакції нуклеофільних R-груп амінокислотних залишків з альдегідами (4-гідрокси-2-ноненаль, МДА, 2-пропенал [акролеїн]), що утворюються за ПОЛ, або з реакційноздатними карбонільними похідними (кетоаміни, кетоальдегіди,

дезоксиозони), які формуються у реакціях глікації та глікоксидації з утворенням кінцевих продуктів глікації / ліпоксидації [38].

Накопичення ОМБ порушує нормальне функціонування клітини та сприяє розвитку різних патологічних станів в організмі в цілому [9]. Крім того, утворений пул ОМБ робить їх чутливішими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки можуть бути джерелом вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів ОМБ може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини, що сприятиме розвитку та прогресуванню захворювань [25].

Іншим відомим біомаркером окиснювальної модифікації білків є AOPPs. До цієї групи модифікованих білків належать дитирозин, пентозидин і карбоніловмісні білкові продукти. На відміну від карбонілювання, яке обумовлене прямим окисненням залишків амінокислот АФО або неокиснювальними реакціями з карбоніловмісними окисненими ліпідами, AOPPs утворюються за іншим механізмом модифікації білка.

Кінцеві продукти окиснення білків формуються у реакції хлоровмісних окисників (хлораміни, HClO) з білками плазми (найчастіше альбуміни) і є найбільш часто вимірюваним біомаркером оксидативного стресу за багатьох захворювань. Гіпохлоритна кислота в живих організмах утворюється в результаті реакції нейтралізації H_2O_2 за дії МПО. Мієлопероксидаза – це прооксидантний ензим, який виділяється з гранул активованих нейтрофільних гранулоцитів, моноцитів і макрофагів у місцях запалення. Отже, активність МПО і пов’язаний з нею рівень AOPPs є біохімічними маркерними показниками запальних і патологічних процесів вільнорадикального характеру [85].

1.4. Сигнальні механізми AGE–RAGE в патогенезі цукрового діабету

1.4.1. Механізм формування AGEs та різновиди їх рецепторів

Ще одним важливим аспектом у розумінні патогенезу дисфункції лейкоцитів і запальних порушень за діабету є здатність глюкози або її аналогів взаємодіяти з

білками або ліпідами. Продукти цієї неензиматичної реакції, що називаються AGEs, пов'язані з розвитком тривалих ускладнень діабету [26]. Кінцеві продукти глікації та їх попередники утворюються і за фізіологічних умов, проте в менших кількостях, ніж за ЦД, атеросклерозу та інших патологій [31].

Формування AGEs є складним молекулярним процесом, що включає три основні етапи. Під час класичної реакції Майяра електрофільні карбонільні групи глюкози або інших реакційноздатних моносахаридів реагують із вільними аміногрупами амінокислотних залишків (особливо лізином або аргініном), утворюючи нестабільні основи Шиффа. Подальша перебудова призводить до утворення стабільнішого кетоаміну – продукту Амадорі (рис. 1.1).

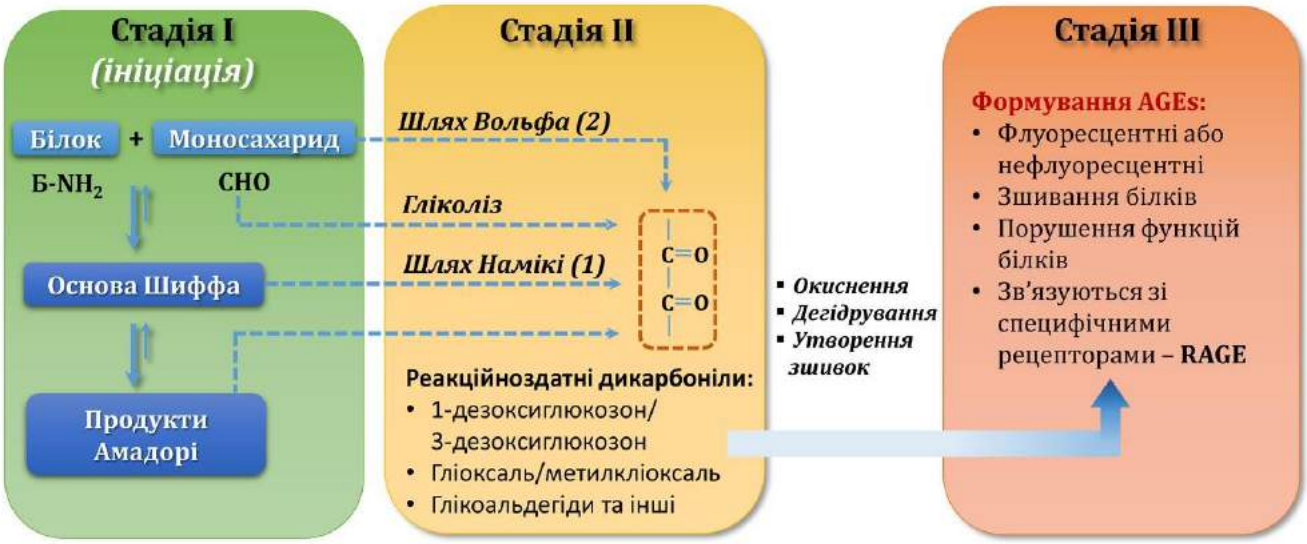


Рис. 1.1. Основні стадії утворення AGEs (*адаптовано з* Wu et al., 2011 [217])

Найчастіше агентами глікації в біологічних системах є глюкоза, фруктоза, мальтоза, маноза, арабіноза, галактоза, оскільки вони у відносно високих концентраціях наявні в живих організмах. Проте моносахариди відрізняються між собою за здатністю до глікації. Глюкоза вважається однією з найменш активних серед вуглеводів, які вступають в реакцію Майяра [235]. Проте фруктоза, яка утворюється в надмірній кількості за гіперактивації поліолового шляху, є в 10 разів потужнішим агентом глікації, ніж глюкоза.

На другій стадії основи Шиффа та продукти Амадорі перетворюються на реакційноздатні дикарбонільні сполуки, такі як гліоксаль, метилгліоксаль та

3-дезоксиглюкозон у разі дегідратації, окиснення та інших хімічних реакцій (рис. 1.1) [110; 192]. Формування AGEs шляхом аутоокиснення продуктів Амадорі відоме як шлях Ходжа. Окрім того, утворення рекційноздатних карбонільних сполук можливе не лише з продуктів Амадорі, а й внаслідок деградації ліпідів та амінокислот, відщеплення дикарбонільних сполук від альдімінів (шлях Намікі), а також утворення карбонільних сполук за аутоокиснення глюкози, рибози, фруктози та гліцеральдегіду (шлях Вольфа, рис. 1.1) [157].

На заключному етапі глікації в процесі реакцій окиснення, дегідратації та циклізації утворюються незворотні сполуки, які називаються AGEs (рис. 1.1). Інтенсивність протікання цих реакцій залежить від концентрації глюкози, реактивної здатності аміногруп, періоду півжиття і концентрації білків [4]. Прискорене утворення AGEs теж може бути спричинене різними патологічними станами, зокрема гіперглікемією та оксидативним стресом за ЦД. В умовах оксидативного стресу деякі іони металів (наприклад, купрум) можуть посилювати глікацію білків та ініціювати глікоксидацію [143].

Вміст AGEs залежить не лише від швидкості їх утворення, але й від здатності організму їх виводити за допомогою внутрішніх шляхів детоксикації. Однією зі сполук, що залучені в процес детоксикації AGEs, є відновлений глутатіон, який каталізує перетворення гліоксалю та метилгліоксалю у менш токсичний D-лактат. Інші механізми включають залучення ферментів – фруктозамінкіназ, які фосфорилюють продукти Амадорі, що призводить до їх дестабілізації та спонтанного розпаду [169].

Глікований гемоглобін (HbA1*c*) – один з найбільш вивчених глікованих білків, що утворюється внаслідок неензиматичної реакції глюкози з аміногрупами лізину та N-кінцевим валіном β-ланцюгів молекули гемоглобіну [92], і зазвичай використовується в клінічній практиці як показник контролю глікемії.

В останні роки було ідентифіковано багато інших AGEs, які є сполуками з різноманітною хімічною структурою. За фізико-хімічними властивостями AGEs можна поділити на кілька груп [169; 195]: флюоресцентні, утворюють білково-білкові зшивки; нефлюоресцентні, не утворюють білок-білкових зшивок;

нефлюоресцентні, що утворюють зшивки; флюоресцентні, які не утворюють білкові зшивки.

Основними охарактеризованими флюоресцентними AGEs, що утворюють білково-білкові зшивки, є пентозидин, пентодилізин, AGE-XI, весперлізин A та весперлізин C. Ідентифіковано також інші AGEs, що утворюють білкові зшивки, але є не флюоресцентними сполуками. До цієї групи належать гліоксаль-лізиновий димер та метилгліоксаль-лізиновий-димер, які утворюються внаслідок реакції між двома бічними ланцюгами лізину та двома молекулами гліоксалю та метилгліоксалю, відповідно. До групи нефлюоресцентних AGEs, що не утворюють зшивки, належать карбоксиметиллізин, карбоксиетиллізин, пірралін та імідазолони, які залучені в патогенезі діабету, запалення й інших захворювань. На додаток, у крові хворих на ЦД виявляється цілий ряд флюоресцентних AGEs, що не утворюють зшивки. Вони за структурою схожі на флюоресцентні AGEs, за винятком того, що один із зв’язків поєднує гетероциклічну частину з амінокислотою і замінюється NH-зв’язком [169; 195].

Вплив AGEs на організм опосередковується їх взаємодією зі специфічними рецепторами. Клітинні рецептори до AGEs можна класифікувати на два типи: рецептори, які зв’язують AGEs та ініціюють різноманітні сигнальні шляхи, й рецептори, що взаємодіють з AGEs і спричиняють їх деградацію. Наприклад, такі рецептори як AGE-R1 (олігосахарилтрансфераза-48), AGE-R2 (80K-H фосфопротеїн), AGE-R3 (галектин-3) та рецептори макрофагів класу A здатні розпізнавати та зв’язувати AGEs, але не передають внутрішньоклітинні сигнали після взаємодії з лігандами. Натомість вони можуть сприяти кліренсу та можливій детоксикації AGEs. Деякі рецептори-скавенджери (англ. scavenger receptor – SR): SR-A, SR-B, SR-E та FEEL рецептор-скавенджер 1 та 2 типу (з англ. FEEL-1/2 – the fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-2) теж здатні зв’язувати AGEs (рис. 1.2) [156; 157].

Найкраще схарактеризованим є рецептор для AGE – RAGE, який є мультилігандним глікопротеїновим рецептором типу 1 з молекулярною масою 45–55 кДа. Цей рецептор належить до надродини імуноглобулінів [178]. Він є

рецептором розпізнавання патернів, який окрім AGE, зв'язує також S-100/кальграну́ліни, амфотерин B1, транстиретин, інтегрини лейкоцитів, антиген макрофагів-1 (Mac-1), β-амілоїдні пептиди та фібрили.

У структурі RAGE виділяють позаклітинний домен, що містить одну імуноглобулінову ділянку V-типу та дві C-типу, єдиний гідрофобний трансмембранний домен і короткий цитоплазматичний хвіст, що є важливим для передачі сигналу від RAGE (рис. 1.2) [230].

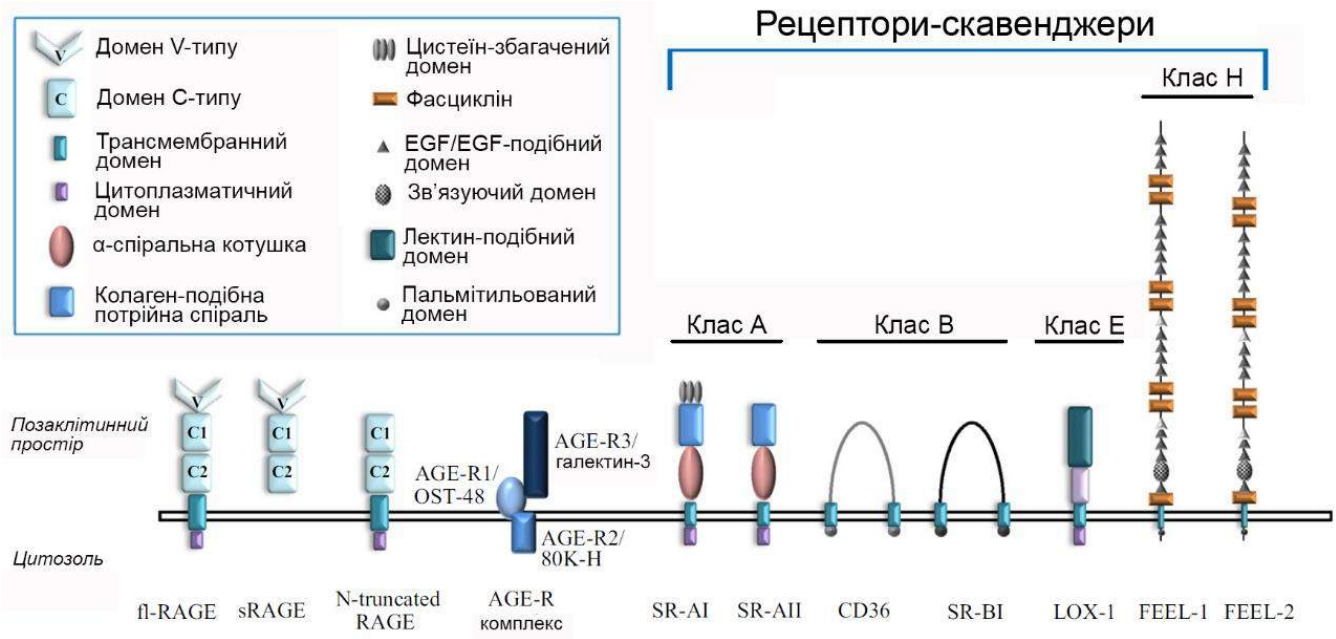


Рис. 1.2. Структура різних типів рецепторів AGEs (*адаптовано з* Ott et al., 2014 [157])

Окрім RAGE (також відомий як повнорозмірний RAGE (англ. flRAGE – full-length RAGE)), було описано кілька інших ізоформ рецептора, зокрема його розчинна форма (англ. sRAGE – soluble RAGE). Розчинний RAGE містить ті самі області V і C, що характерні для flRAGE, проте він не має трансмембранної спіралі та цитозольного хвоста (рис. 1.2). Досліджено два типи sRAGEs: esRAGE (з англ. endogenous secretory RAGE – ендогенний секреторний RAGE, який теж відомий як sRAGE_v1) і cRAGE (з англ. cleaved RAGE) [156]. cRAGE утворюється внаслідок розщеплення flRAGE металопротеїназами (ADAM10 та MMP9). esRAGE формується за альтернативного сплайсингу інтрону 9 із видаленням екзону 10 мРНК, що змінює рамку зчитування транскрипту. Це призводить до виникнення

передчасного стоп-кодону в інтроні 9, який під час трансляції відповідав би трансмембранній спіралі та цитозольному хвосту повнорозмірного варіанту RAGE. Відповідно, утворюється розчинна ізоформа RAGE [99]. Проте, домінантною ізоформою в крові людини є утворений в результаті протеолітичного розщеплення – cRAGE [180].

RAGEs експресуються в ендотеліальних клітинах, мононуклеарних фагоцитах, гепатоцитах, лімфоцитах, клітинах гладеньких м'язів судин, клубочкових клітинах і нейронах. Легенева тканина має найвищу експресію RAGE [27; 133]. За фізіологічних умов у тканинах і судинах експресія RAGE мінімальна, хоча вона саморегулюється взаємодією RAGE з лігандами через механізм, що активується внутрішньоклітинними окисно-відновними процесами. Зокрема у тканинах, де відбувається накопичення прозапальних лігандів, посилюється клітинна активація або стрес, експресія RAGE помітно збільшується [156].

1.4.2. Роль сигнального шляху AGE–RAGE за цукрового діабету

Утворення AGEs – це необоротний процес формування глікованих продуктів у системі кровообігу й інших тканинах, де є білки з тривалим періодом півжиття (колаген, еластин). Проте, AGEs також можуть зв'язуватися з білками з коротким періодом напіввиведення, зокрема сироватковим альбуміном [173]. Встановлено, що глікація альбуміну, фібриногену та глобулінів спричиняє зміни у зв'язуванні ліків у плазмі, обумовлює активацію тромбоцитів, утворення АФО, порушення фібринолізу та регуляції імунної системи [192].

AGEs та їх попередники можуть спричиняти пошкодження клітин за трьома загальними механізмами. По-перше, глікація білків призводить до зміни їх функцій. По-друге, компоненти позаклітинного матриксу, модифіковані попередниками AGE, аномально взаємодіють з іншими компонентами матриксу та рецепторами (інтегринами), які експонуються на поверхні клітин. Глікація білків є одним з факторів, що призводить до дефектів на рівні лейкоцитарно-ендотеліальних взаємодій та хемотаксису за ЦД [186]. Зокрема, гліковані білки, виділені з сироватки щурів з ЦД, знижують плинність мембрани лейкоцитів за введення їх контрольним тваринам і впливають на міграційну здатність клітин [145]. Інші дослідження

демонструють порушення міграції нейтрофілів крізь моношар ендотеліоцитів, спричинену пептидом форміл-Met-Leu-Phe, що свідчить про зниження здатності клітин реагувати на хемоатрактанти та мітогени [34]. Також було виявлено, що взаємодія AGE із рецептором на поверхні нейтрофілів людини пов'язана зі зростанням внутрішньоклітинного Ca^{2+} та полімеризацією актину [5].

Ще одним і основним механізмом впливу AGEs є їх взаємодія з специфічними рецепторами на клітинах. Зв'язування лігандів з RAGE стимулює різні сигнальні шляхи, активуючи ERK1/2, MAPK, фосфатидилінозитол-3′-кіназу, p21Ras, JNK/SAPK (з англ. c-Jun-N-terminal kinase/Stress activated protein kinase) [21]. Ці сигнальні каскади регулюють NF-κB, що призводить до подальшої транскрипції багатьох генів прозапальних шляхів, а також експресії молекул адгезії, факторів росту, прозапальних цитокінів, які беруть участь у патогенезі діабетичних ускладнень. Кінцеві продукти глікації, зв'язуючись зі своїми рецепторами, можуть безпосередньо стимулювати утворення АФО за участі НАДФН-оксидаз та/або інших механізмів (активації дихального ланцюга мітохондрій, мікросомальних ферментів, ксантиноксидази й ензимів метаболізму арахідонової кислоти) [157; 214]. Водночас, взаємодія AGE–RAGE призводить до зниження рівня GSH та аскорбінової кислоти і, таким чином, сприяє посиленню внутрішньоклітинного оксидативного стресу. Окрім того, виснаження пулу GSH обумовлює зменшення рециркуляції та зниження активності гліоксалази-1 – ферменту, що відіграє важливу роль у запобіганні утворенню внутрішньоклітинних AGEs [21].

Взаємодія AGE з RAGE може бути причетною до дисфункції панкреатичних острівців, порушення секреції інсуліну й, таким чином, відігравати важливу роль в патогенезі ЦД. Деякими дослідженнями встановлено, що зв'язування RAGE із лігандами індукує апоптичну загибель INS-1 клітин (лінія β-клітин підшлункової залози щура) та панкреатичних острівців [126; 233].

Інгібування RAGE антисироваткою до цих рецепторів продемонструвало здатність запобігати токсичному впливу на клітини, спричиненому AGEs, за мікросудинних ускладнень діабету. Отже, пригнічення формування AGEs є одним із

методом терапії ЦД, який не залежить від контролю рівня глюкози в крові, і є важливим для попередження розвитку ускладнень [173].

1.5. Роль лікарських рослин у лікуванні цукрового діабету: компонентний склад та механізми дії біологічно активних сполук

Сучасні підходи до лікування ЦД спрямовані на нормалізацію патологічних процесів, що лежать в основі захворювання, а саме регуляція рівня глюкози в крові, покращення функціонування β-клітин підшлункової залози, зниження інсулінорезистентності периферичних тканин і нівелювання токсичного впливу оксидативного стресу на клітини й органи [238].

На сьогоднішній день терапія для покращення стану за ЦД включає ін’єкції інсуліну та пероральні гіпоглікемічні препарати. Проте використання синтетичних препаратів обмежується їх фармакокінетичними властивостями, обмеженою дією та побічними ефектами, такими як гіпоглікемія, інтоксикація молочною кислотою, розлад шлунково-кишкового тракту тощо. Часто антидіабетичне лікування може передбачати призначення одночасно декількох препаратів, які здатні посилювати ступінь тяжкості цих побічних ефектів [111]. Це обумовлює необхідність пошуку ефективніших схем терапії даного патологічного стану, а також створення нових антидіабетичних препаратів [238].

Ще до відкриття та впровадження синтетичних гіпоглікемічних засобів, у лікуванні ЦД широко застосовувалась фітотерапія. Фітопрепарати надалі залишаються перспективним засобом терапії діабету, оскільки вони, зазвичай, не акумулюються в організмі, є малотоксичними і тому спричиняють мінімум побічних ефектів у разі застосування. Біологічно активні фітохімічні компоненти лікарських рослин можуть бути використані як хороша альтернатива у комплексному виробництві ліків, спрямованих на покращення стану людей, хворих на ЦД.

На відміну від інсулінозалежного діабету, за ЦД 2 типу стан хворих можна покращити за допомогою дієти, фізичної активності та рослинних продуктів, що вже широко практикується у всьому світі. Водночас, було встановлено, що застосування фітопрепаратів може сприяти зниженню доз інсуліну і синтетичних лікарських засобів за лікування ЦД 1 типу [238; 240].

Серед можливих механізмів дії лікарських рослин, що спрямовані на покращення стану за діабету можна виділити: посилення секреції інсуліну [142; 196]; стимулювання процесів регенерації β-клітин підшлункової залози [105; 144; 154]; зниження синтезу глюкози в печінці та посилене її засвоєння в м'язах і жировій тканині [30; 76; 185]; зменшення всмоктування глюкози клітинами кишечника внаслідок інгібування ферментів перетравлення вуглеводів, зокрема α-амілази та α-глюкозидази, тощо. З іншого боку, вторинна антидіабетична активність медичних рослин передбачає захист від ускладнень, пов'язаних з діабетом, включаючи нейропротекторні, антиапоптотичні, протизапальні й антиоксидантні властивості [56].

Пригнічення всмоктування глюкози у тонкому кишечнику є важливим напрямом фармакологічних досліджень, пов'язаних з терапією ЦД. Інгібування травних ферментів, які гідролізують складні полісахариди та дисахариди, є прямим механізмом зменшення всмоктування глюкози з просвіту кишечника в кров і, як наслідок, зниження потреб організму в інсуліні. Прикладом цієї групи інгібіторів є інгібітори α-глюкозидази ссавців, що можуть бути отримані з природних джерел, зокрема мікроорганізмів і лікарських рослин [90; 223].

Супутні ускладнення діабету є наслідком окиснювального пошкодження тканин. Науковими дослідженнями встановлено, що деякі антидіабетичні рослини здатні знешкоджувати вільні радикали, гасячи електронно-збудженні молекули, зменшують утворення гідропероксидів і послаблюють утворення АФО через модуляцію декількох ферментів, включаючи ксантиноксидазу, мікросомальну монооксигеназу, ЦОГ, ЛОГ, НАДН-оксидазу та сукцинатоксидазу. Більш того, поліфеноли, що наявні в складі рослин, посилюють ендогенну АОС, запобігають окиснювальному пошкодженню, зменшують ПОЛ та активують антиоксидантні ферменти (СОД, КАТ, ГПО) [158]. Отже, за ЦД виникає потреба у застосуванні препаратів на основі рослинної сировини як ефективних дієтичних допоміжних засобів під час терапії різноманітних ускладнень. Тому, пошук комплексних препаратів для полегшення стану хворих на ЦД є перспективним напрямком досліджень [189].

Здебільшого антидіабетична дія лікарських рослин обумовлена наявністю в їхньому складі біологічно активних речовин: флавоноїдів, сапонінів, алкалоїдів, танінів, глікозидів, терпенів тощо. Чимало наукових досліджень розкривають можливі механізми дії природних фітохімічних сполук за діабету.

Антидіабетичні властивості флавоноїдів частково пояснюються їх антиоксидантним потенціалом, а також здатністю модулювати активність деяких сигнальних шляхів. Одними з поширених природних біоактивних сполук, що належать до флавоноїдів, є кверцетин і кемпферол та їх глікозиди. Наприклад, кемпферол може інгібувати апоптоз, знижувати активність каспази-3 у β-клітинах, а також здатний регулювати синтез і секрецію інсуліну шляхом стимуляції поглинання Ca^{2+} мітохондріями. Його властивості також пов'язані з посиленням синтезу антиоксидантів і зниженням секреції ІЛ-1β, ФНП-α, пригніченням ПОЛ та глікації гемоглобіну [18; 231]. Ці дані свідчать про те, що кемпферол може застосовуватись як природна сполука, яка здатна захищати β-клітини від глюкозотоксичності.

Інший флавоноїд – кверцетин – може посилювати активність антиоксидантних ферментів, пригнічувати ПОЛ та GLUT2-опосередковане поглинання глюкози в кишечнику. Здатність кверцетину модулювати абсорбцію глюкози через інгібування GLUT2 робить його перспективним об'єктом досліджень у розробці гіпоглікемічних препаратів. Проте, механізми дії кверцетину є плейотропними і, окрім пригнічення кишкової абсорбції глюкози, він впливає на секрецію та чутливість до інсуліну, а також сприяє покращенню утилізації глюкози в периферичних тканинах [89; 159].

Численними дослідженнями встановлено, що інша група сполук – антоціани також відіграють важливу роль у профілактиці діабету. Виявлено, що антоціани знижують резистентність до інсуліну, що пов'язано з підвищенням регуляції експресії гена GLUT4 та активації АМФ-активованої протеїнкінази. Окрім того, антоціани сприяють поглинанню та використанню глюкози тканинами [183]. Антидіабетична дія ціанідину проявляється через здатність інгібувати α-глюкозидазу й α-амілазу підшлункової залози. Він запобігає апоптозу клітин підшлункової залози та покращує антиоксидантний статус. Інший представник

групи антоціанідинів – дельфінідин виявляє антиоксидантний ефект і сприяє зменшенню глікування альбуміну та гемоглобіну. Пеларгонідин здатний полегшувати оксидативний стрес, знижувати рівень нітритів і стимулювати секрецію інсуліну [86].

В складі багатьох рослин часто виявляють терпеноїди (ізопреноїди). Ці біологічно активні сполуки можуть проявляти антидіабетичний потенціал завдяки здатності стимулювати секрецію інсуліну [3; 45] та впливати на транслокацію GLUT4 [66; 98]. Деякі дитерпени можуть інгібувати активність α-глюкозидази та альдозоредуктази [1; 146]. Одними з важливих, але мало вивчених представників групи монотерпеноїди є іридоїди. Деякі сполуки цього класу проявляють гіпоглікемічні й антиоксидантні властивості [20; 219]. Попередні дослідження продемонстрували захисну дію логаніну за оксидативного стресу в печінці [163], моронізид виявляв ефективні протизапальні властивості у щурів з гострим інфарктом міокарда [226], сверозид зменшував окисне пошкодження печінки та пригнічував синтез кіназ прозапальних сигнальних шляхів [93], а корнузид виявляв імуномодулювальну та протизапальну активність [102]. Однак основні механізми терапевтичного потенціалу іридоїдів потребують подальших досліджень.

Згідно даних літератури, близько 800 видів рослин можуть виявляти антидіабетичні властивості завдяки наявності в їхньому складі біологічно активних сполук. Проте лише незначна частка лікарських видів рослин досліджена та підтверджені їх гіпоглікемічні властивості на моделях ЦД у тварин і в клінічних аналізах. Такі дослідження можуть виявити ефективні допоміжні засоби для терапії ЦД або природні сполуки для розробки нових антидіабетичних препаратів.

Серед 65 представників родини Cornaceae, два види – *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. – дерен лікарський та *Cornus mas* L. – дерен справжній, проявляють найвираженіші біологічні властивості [36; 77; 164]. Плоди цих рослин здавна використовуються в народній медицині багатьох країн для полегшення та лікування патологічних станів, особливо шлунково-кишкових та порушень обміну речовин, діареї, лихоманки тощо [36; 48]. *Cornus officinalis* займає важливе місце в історії лікування діабету. Ця рослина використовується як один з компонентів китайського

препарату для терапії ЦД – Hachimi-jio-gan. Доведено, що *C. officinalis* проявляє гіпоглікемічний, протизапальний, антиоксидантний, антимікробний ефекти, здатний покращувати функціональний стан печінки та нирок [91; 219]. Для *Cornus mas* L. теж характерними є ряд різноманітних біологічних властивостей, проте цей вид є недостатньо дослідженими за діабету. Важливим є те, що *C. mas* L. зростає на території Південної та Центральної Європи та південно-західної Азії, тоді як *C. officinalis* – це листяне дерево, поширене у Східній Азії, переважно в Китаї, а також Кореї та Японії.

Зважаючи на все вищесказане, дослідження властивостей *Cornus mas* L. на моделях ЦД та впливу екстрактів цієї рослини на ключові біохімічні показники організму за діабету є надзвичайно актуальним. Такі дослідження можуть стати основою для отримання нових терапевтичних засобів чи комплексних препаратів, спрямованих на послаблення чи коригування ускладнень, зумовлених ЦД.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика екстрактів плодів дерену справжнього (*Cornus mas* L.)

Екстракти червоних і жовтих плодів дерену справжнього було надано dr hab. inż. Алісією Кухарською (Вроцлавський природничий університет) для проведення подальших досліджень. Плоди двох сортів (“Янтарний” – BDPA 14131 (зрілі плоди жовтого кольору) і “Подольський” – BDPA 10462 (зрілі плоди червоного кольору) дерену справжнього (*Cornus mas* L.) були зібрані в серпні–вересні 2016 р. в дендропарку в Болестрашице, поблизу Перемишля (Польща) і негайно заморожені за −20 °C. Із заморожених стиглих плодів дерену (20 кг) було отримано 30 г ліофілізованого екстракту [50], який аналізували за допомогою UPLCqTOF-MS/MS та HPLC-PDA.

2.2. Ідентифікація та кількісна оцінка сполук в екстрактах плодів дерену справжнього методами UPLC-qTOF-MS/MS та HPLC-PDA

Ідентифікацію сполук проводили за допомогою системи ультраефективної рідинної хроматографії Acquity (UPLC) у поєднанні з мас-спектрометрією (MS) з квадрупольним аналізатором (Q-TOF) (UPLC/Synapt Q-TOF MS, Waters Corp., Milford, MA, США) та джерелом іонізації електророзпиленням (ESI) [121]. Розподіл сполук було досягнуто на колонці Acquity BEH C18 (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm; Waters). Іридоїди, фенольні кислоти та флавоноли досліджувались у режимі негативного іона, тоді як антоціани – у режимі позитивного іона (процес іонізації молекул проби з утворенням позитивних чи негативних іонів) до та після фрагментації.

Метод високоефективної рідинної хроматографії з матричним фотодіодним детектором (HPLC-PDA) раніше був описаний Kucharska et al. [121]. Кількісний аналіз проводили за допомогою системи Dionex (Germering, Німеччина), оснащеної детектором на діодній матриці Ultimate 3000, четвертинним насосом LPG-3400A, автовідбірником EWPS-3000SI та термостатованим відділенням для колон TCC-3000SD, що контролюється програмним забезпеченням Chromeleon v.6.8 (Thermo

Scientific Dionex, Саннівейл, Каліфорнія, США). Використовували колонку Cadenza Imtakt C5-C18 (75 × 4,6 mm, 5 μm). Іридоїди були виявлені за довжини хвилі 245 нм, антоціани – за 520 нм, фенольні кислоти та їх похідні – за 320 нм, елагова кислота – за 254 нм та флавоноли – за 360 нм. Результати виражали у мг на 100 г сухої маси. Отримані та проаналізовані екстракти червоних плодів, жовтих плодів *Cornus mas* L. та логанова кислота, виділена з жовтих плодів дерену справжнього двох сортів (“Yantarnyi” – BDPA 14131; “Flava” – BDPA 8795) як окремий екстракт, використовували у подальших дослідженнях.

2.3. Характеристика об’єктів досліджень

Об’єктами досліджень були модельні ліпідні мембрани, *α*-глюкозидаза з *Saccharomyces cerevisiae* та лейкоцити периферичної крові й плазма крові щурів у нормі, за експериментального ЦД і на фоні введення екстрактів плодів *Cornus mas* L.

2.4. Методи дослідження біологічної активності екстрактів *Cornus mas* L. на моделі ліпідних мембран

2.4.1. Приготування ліпосом

Одношарові ліпосоми готували з фосфатидилхоліну курячого яйця згідно з методом, описаним Strugała et al. [201]. Ліпіди розчинені в хлороформі (100 мг/мл), упарювали насухо в атмосфері азоту, тоді під вакуумом ще 60 хв. Після упарювання до ліпіду додавали фосфатний буфер (або Tris-HCl), pH 7,4, струшували та піддавали ультразвуковій гомогенізації за 20 кГц та температури 0–2 °C впродовж 15 хв для формування одношарових ліпосом. Приготовані ліпосоми у концентрації 0,1 мг/мл використовували для подальших досліджень.

2.4.2. Аналіз окиснення ліпосом за дії ультрафіолетового випромінювання типу B

Перекисне окиснення ліпідів у модельних ліпідних мембранах стимулювали ультрафіолетовим (УФ) випромінюванням від бактерицидної УФ-лампи інтенсивністю 3,5 мВт × $см^{-2}$ (радіометр UVP, Великобританія) згідно з методикою описаною Gabrielska et al. [72]. Рівень ПОЛ оцінювали за вмістом утворених

ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [28]. Концентрацію ТБК-АП визначали з використанням молярного коефіцієнта екстинкції ε = 156 $мМ^{-1}\times см^{-1}$. Відсоток інгібування окиснення ліпосом досліджуваними екстрактами розраховували за формулою:

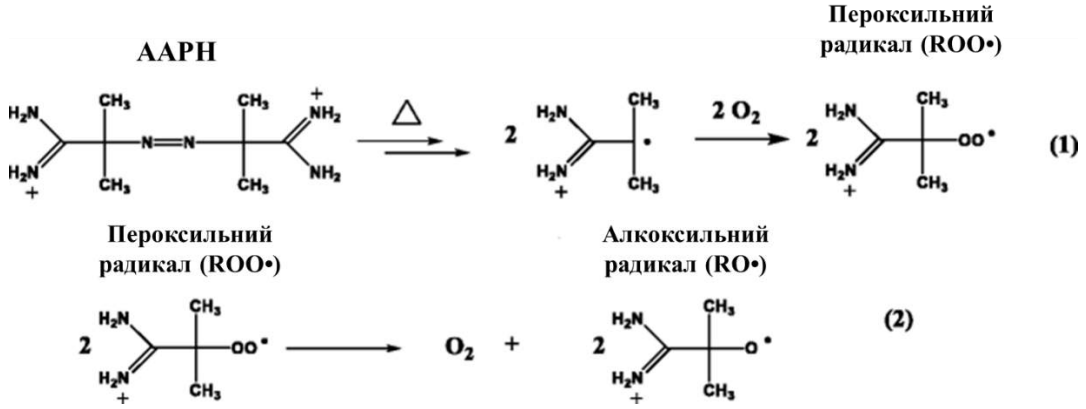
$$\%\ інгібування = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100\ \%,$$

де C_0 – концентрація МДА у зразку без додавання екстракту (контроль), C – концентрація МДА у зразку з додаванням досліджуваного екстракту.

Вимірювання проводили за допомогою спектрофотометра Cary 300 Varian за λ = 535 нм. Параметр IC_{50} розраховували на основі графіків, які відображають залежність між ступенем окиснення ліпідів і концентрацією доданого екстракту.

2.4.3. Оцінка окиснення ліпосом за впливу хімічної сполуки ААРН

Антиоксидантні властивості екстрактів плодів *Cornus mas* L. також досліджували шляхом ініціювання ПОЛ за дії хімічного чинника, згідно з методикою, описаною Strugała et al. [200] з незначними змінами. Ліпосоми, отримані з фосфатидилхоліну курячого яйця, інкубували впродовж 30 хв у темряві з додаванням флюоресцентного зонда DPH-PA (з англ. diphenylhexatriene-propionic acid) у концентрації 1 мкМ. Як джерело вільних радикалів використовували хімічну сполуку ААРН (з англ. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Термічне розкладання ААРН призводить до вивільнення молекулярного азоту та 2 радикалів, які можуть взаємодіяти, формуючи стабільні продукти або реагувати з молекулярним киснем з утворенням пероксильних радикалів:



Вільні радикали окиснюючи зонд DPH-PA, який вбудований в ліпідну мембрану, спричиняють зменшення його флюоресценції, що дає змогу характеризувати ступінь ПОЛ ліпосом.

Окиснення ініціювали безпосередньо перед вимірюванням, додаючи у пробірку з приготованими ліпосомами розчин AAPH у концентрації 1 М та різні концентрації досліджуваних екстрактів (екстракти плодів *Cornus mas* L. розчиняли у 80% розчині етанолу). Контрольна проба замість розчину екстрактів містила фосфатний буфер (pH 7,4), а до складу холостої проби входив лише розчин ліпосом із вбудованим зондом. Вимірювання проводили за допомогою флюориметра Cary Eclipse за температури 37 °C та хвилі збудження λ = 355 нм та випромінювання λ = 430 нм впродовж 30 хв. Значення відносної інтенсивності флюоресценції DPH-PA було прийнято як міру ступеня окиснення ліпідів ліпосом.

Відсоток інгібування окиснення ліпідів розраховували за формулою:

$$\%\ \textit{інгібування} = \frac{F_S - F_C}{F_B - F_C} \cdot 100\ \%,$$

де F_S – відносна флюоресценція зонда у складі ліпосом, що зазнавав окиснення за додавання розчину AAPH та досліджуваних екстрактів, F_C – відносна флюоресценція контрольного зразка, F_B – відносна флюоресценція холостої проби.

2.5. Дослідження інгібувальної здатності екстрактів плодів *Cornus mas* L. на активність α-глюкозидази

Вплив екстрактів на активність α-глюкозидази (EC 3.2.1.20) Saccharomyces cerevisiae (G5003, 18,5 U мг$^{-1}$, Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St Louis, USA)) визначали згідно з методикою, описаною Kim et al. [114]. Як субстрат використовували *p*-нітрофеніл глюкопіранозид (pNPG), який розчиняли в 0,1 М фосфатному буфері (pH 6,9) безпосередньо перед дослідом.

У пробірки вносили 100 мкл α-глюкозидази (1 U мл$^{-1}$) і 50 мкл розчину екстракту в різних концентраціях (0,02–0,20 мг мл$^{-1}$) або акарбози (позитивний контроль) та інкубували за температури 37 °C впродовж 10 хв. Після інкубації реакцію запускали додаванням 50 мкл 3 мМ розчину субстрату та знову інкубували за температури 37°C впродовж 20 хв. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 0,1 М

розчину Na_2CO_3. Активність α-глюкозидази визначали вимірюванням оптичної густини продукту реакції жовтого кольору (*p*-нітрофенол) за довжини хвилі 405 нм проти холостої проби. В контрольні проби (загальна активність ферменту) замість розчинів екстрактів або акарбози вносили 0,1 М фосфатний буфер.

Відсоток інгібування розраховували за формулою:

$$\%\ інгібування = ((Ек - Ед) / Ед) \times 100\%,$$

де *Ек* – оптична густина контрольної проби (100% активність ферменту), *Ед* – оптична густина досліджуваного зразка, у який додавали екстракти *Cornus mas* L. або акарбозу.

Концентрації екстрактів, що спричиняли 50% пригнічення активності ферменту (IC_{50}), визначали графічно.

2.6. Визначення типу інгібування α-глюкозидази

Тип інгібування α-глюкозидази екстрактами червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. та логановою кислотою визначали згідно з методикою, описаною Kazeem et al. [107] з незначними змінами. У пробірку додавали 100 мкл α-глюкозидази (0,1 U мл$^{-1}$) і 50 мкл розчину субстрату (pNPG) у різних концентраціях (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0 та 3,0 мМ) за наявності або за відсутності екстрактів. Реакційну суміш інкубували за температури 37 °С впродовж 20 хв і реакцію зупиняли додаванням 150 мкл 0,2 М розчину Na_2CO_3.

Тип інгібування активності α-глюкозидази визначали шляхом аналізу графіка в обернених координатах Лайнуївера-Берка з використанням кінетики Міхаеліса-Ментен [128].

2.7. Умови проведення досліджень на експериментальних тваринах

Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Wistar масою 120–180 г. Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води і перебування у стандартних умовах віварію. Експерименти проводились згідно з документом “Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах”, ухваленим Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які

використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1985). Досліди з тваринами також виконано відповідно до інструкцій з догляду та використання лабораторних тварин Львівського національного університету імені Івана Франка та схвалені Комітетом з контролю етичних норм поводження з тваринами кафедри біохімії біологічного факультету.

Експериментальні тварини були рандомно розділені на групи: *перша* – контроль (К), *друга* – тварини з експериментальним ЦД, *третя* – тварини з ЦД, яким вводили екстракт червоних плодів *Cornus mas* L. (ЦД + ЧД), *четверта* – тварини з ЦД, яким вводили екстракт жовтих плодів *Cornus mas* L. (ЦД + ЖД), п’ята – тварини з ЦД, яким вводили логанову кислоту (ЦД + ЛК).

Експериментальний ЦД індукували внутрішньоочеревиним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США), розчиненого в 10 мМ цитратному буфері (pH 4,5), з розрахунку 55–60 мг на 1 кг маси тіла. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали через 72 год після введення СТЦ. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози більше 12 ммоль/л. Починаючи з 10-го дня від моменту індукції діабету тваринам перорально вводили екстракти *Cornus mas* L. у концентрації 20 мг/кг маси тіла тварини, натомість щурі контрольної групи та з цукровим діабетом отримували воду per os впродовж 14 днів.

Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 25-й день експерименту. Забір крові для досліджень проводили у порцелянові чаші з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100). Частину крові центрифугували впродовж 15 хв за 3000 об/хв для одержання плазми.

2.8. Визначення концентрації глюкози в крові глюкозооксидазним методом

Для визначення концентрації глюкози в крові використовували аналітичний набір “Філісіт-Діагностика” (Україна). Принцип методу базується на реакції окиснення глюкози до глюконової кислоти з утворенням гідроген пероксиду. За наявності пероксидази H_2O_2 реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоного кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації глюкози в крові [207].

Для проведення аналізу до 0,9 мл стабілізуючого розчину (1,34% розчин натрій щавлевокислого у 0,85% NaCl) вносили 0,1 мл цільної крові. Проби центрифугували для осадження еритроцитів впродовж 5 хв за 3000 об/хв. Для приготування дослідної проби відбирали 0,02 мл надосадової рідини, додавали 0,1 мл буферу та 0,1 мл розчину ензимів з набору. Калібрувальна проба замість зразка містила 0,02 мл калібрувального розчину глюкози (стандартний розчин глюкози з набору розведений у 10 разів), а в холосту пробу додавали 0,02 мл фізіологічного розчину. Усі зразки вносили у 96-лункову планшетку та інкубували впродовж 20 хв за кімнатної температури. Оптичну густину розчину вимірювали на планшетному рідері фірми Epoch за довжини хвилі 540 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

Тест на визначення толерантності до глюкози [63] проводили вранці після 15–17-годинного голодування тварин. Навантаження глюкозою здійснювали пероральним введення розчину глюкози у розрахунку 1 г на 1 кг маси тіла тварини. До навантаження та через 30, 60, 90, 120 хв після введення глюкози проводили забір крові з хвостової вени щурів. Рівень глюкози визначали глюкозооксидазним методом. За одержаними даними будували графік – глікемічну криву: натще – 0 точка, через 30 хв після прийому розчину глюкози – 1-ша точка, через 60 хв – 2-га точка, через 90 хв – 3-тя точка, через 120 хв – 4-та точка.

Як критерій сумарної відповіді на стандартний глюкозотолерантний тест розраховували інтегральний показник площі під глікемічними кривими – *AUCglu* (з англ. area under a curve), який відображає загальне підвищення концентрації глюкози. *AUCglu* розраховували за допомогою правила трапецій [222].

2.10. Визначення кількості еритроцитів

У пробірку вносили 4 мл рідини для розведення (0,9% NaCl), в яку додавали 0,02 мл цільної крові з антикоагулянтом. Суміш ретельно перемішували і заповнювали камеру Горяєва. Проводили підрахунок за малого збільшення мікроскопа (об'єктив ×8, окуляр ×15) у затемненому полі зору [245].

Еритроцити підраховували у п'яти великих (80 малих) квадратах. Кількість еритроцитів в 1 мкл крові обчислювали за формулою:

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

де x – кількість еритроцитів в 1 мкл крові; a – кількість клітин, що були підраховані у певній кількості малих квадратів; $б$ – кількість малих квадратів, у яких рахували еритроцити; $в$ – розведення крові.

2.11. Визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика

Відмиті еритроцити розводили у 0,9% NaCl до отримання екстинкції 0,700 за довжини хвилі 630 нм. У дослідну кювету вносили 1 мл робочої суспензії еритроцитів і додавали 1 мл 0,004 н. розчину HCl, розведеного на 0,9% розчині NaCl. Через 30 с з моменту внесення гемолітика фіксували перше значення екстинкції за довжини хвилі 630 нм. Вимірювання проводили за підтримання сталої температури (24 °C). Покази приладу знімали кожні 30 с, доки значення екстинкції не переставало зменшуватись. Між кожними двома значеннями екстинкції вираховували ΔE, що відповідає частці гемолізованих еритроцитів на даний проміжок часу. На основі отриманих значень будували криву залежності гемолізу еритроцитів (у %) від часу гемолізу (еритрограму). Резистентність еритроцитів визначали за наступними параметрами: тривалість гемолізу (хв), пік гемолізу еритроцитів (хв), максимальна кількість гемолізованих еритроцитів за 0,5 хв (у %). Криву часової залежності кількості гемолізованих еритроцитів розділяли на три відрізки: відрізок від 1,5 до 3 хв – еритроцити зі зниженою стійкістю (старі); відрізок від 3,5 до 4,5 хв відповідає середньостійким еритроцитам (середнього віку); відрізок від 5 хв характеризує еритроцити із підвищеною стійкістю (молоді) [245].

2.12. Визначення концентрації гемоглобіну

Визначення концентрації гемоглобіну проводили ціанметгемоглобіновим методом [245]. Принцип методу полягає у тому, що кров змішують з реактивом (реактив Драбкіна: $NaHCO_3$ – 1 г; KCN – 0,05 г; $K_3[Fe(CN)]_6$ – 0,2 г; дистильованої води – до 1,0 л), який перетворює гемоглобін у ціанметгемоглобін, що вимірюють фотометрично.

У пробірці змішували 5 мл реактиву Драбкіна з 0,02 мл крові і через 20 хв (час необхідний для повного перетворення гемоглобіну в ціанметгемоглобін) вимірювали екстинкцію за довжини хвилі 540 нм проти води. Концентрацію гемоглобіну обчислювали за формулою:

$$C_{Нв} = E_{540} \times 36,77 \text{ (г \%)},$$

де $C_{Нв}$ – концентрація гемоглобіну, E_{540} – екстинкція досліджуваної проби, 36,77 – коефіцієнт перерахунку.

Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті визначають діленням концентрації гемоглобіну на кількість еритроцитів у певному об’ємі крові (1 мкл).

2.13. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну

Вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA1*c*) в еритроцитах визначали колориметричним методом [211; 245], який ґрунтується на кислотному гідролізі кетоамінного зв’язку гемоглобіну щавлевою кислотою. У результаті реакції утворюється 5-оксиметилфурфурол, який, взаємодіючи з тіобарбітуровою кислотою, утворює забарвлений комплекс, оптична густина якого визначається фотометрично.

Еритроцити відділяли від плазми центрифугуванням за 3000 об/хв впродовж 15 хв. Плазму відбирали. Еритроцити тричі промивали охолодженим фізіологічним розчином (0,9% розчин NaCl) за 3000 об/хв по 5 хв. Відмиті еритроцити гемолізували дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3 і центрифугували за 12000 об/хв впродовж 15 хв для видалення стром еритроцитів.

До 2 мл супернатанту додавали 1 мл 0,3 М розчину щавлевооцтової кислоти. Суміш інкубували за температури 95 °С впродовж 1 год, охолоджували і додавали 1 мл 40% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО), струшували і центрифугували

10 хв за 3000 об/хв. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 0,05 М розчину ТБК та інкубували за температури 40°С впродовж 40 хв. Через 20 хв вимірювали оптичну густину досліджуваного зразка за довжини хвилі 443 нм. Значення екстинкції 0,029 відповідає концентрації HbA1*c*, що становить 1%.

2.14. Виділення лейкоцитів з периферичної крові щурів

Загальну фракцію лейкоцитів виділяли у градієнті густини фікол-тріомбраст (ρ = 1,076–1,078) [239]. У пластикову пробірку вносили 3 мл фікол-тріомбрасту і зверху нашаровували 5–7 мл крові, попередньо розведеної забуференим фізіологічним розчином (ЗФР: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na_2HPO_4, 1,7 мМ KH_2PO_4, pH 7,4) у співвідношенні 1 : 1. Центрифугували за 1500 об/хв впродовж 20 хв. Після центрифугування відбирали кільце лейкоцитів, яке знаходиться на межі між еритроцитами та плазмою. Отриману суспензію лейкоцитів тричі промивали ЗФР за 3000 об/хв по 5 хв.

2.15. Визначення кількості лейкоцитів

Для підрахунку кількості виділених лейкоцитів у пробірку вносили 0,02 мл 3% розчину оцтової кислоти, підфарбованого метиленовим зеленим, і 0,02 мл суспензії лейкоцитів. Суміш ретельно перемішували, заповнювали камеру Горяєва і проводили підрахунок клітин у 100 великих (1600 малих) квадратах [245]. Кількість лейкоцитів в 1 мкл крові обчислювали за формулою:

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

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 клітини; *в* – розведення крові.

2.16. Підрахунок лейкоцитарної формули крові

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 [245].

Робочий розчин фарби Романовського-Гімзи наливали на мазок і залишали на 30–35 хв. Потім мазки промивали проточною водою і висушували на повітрі.

2.17. Флюоресцентно–мікроскопічне дослідження рівня активних форм оксигену у лейкоцитах периферичної крові щурів

Кількість АФО в лейкоцитах крові визначали згідно з методикою, описаною Gomes et al. [83], використовуючи 2′,7′-дихлородигідрофлюоресцеїн діацетат (англ. H_2DCFDA – 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), який здатний спонтанно проникати через мембрану всередину клітини. За участі неспецифічних естераз, локалізованих в цитозолі він перетворюється у нефлюоресцентну сполуку – дихлородигідрофлюоресцеїн, який після окиснення перетворювався у флюоресціюючий 2′,7′-дихлорфлюоресцеїн (англ. DCF – dichlorofluorescein). Окиснення дихлородигідрофлюоресцеїну відбувається за дії гідроксильних ($HO^{\bullet}$) і пероксильних ($ROO^{\bullet}$) радикалів, а також NO та пероксинітриту.

Виділені лейкоцити (2×10^6 клітин) ресуспендували у ЗФР (pH 7,4) та інкубували в темряві з H_2DCFDA у концентрації 5 мкМ впродовж 30 хв за температури 37 °С. Після інкубації клітини осаджували та промивали у буферному розчині. Зразки аналізували на флюоресцентному мікроскопі Nikon Optiphot 2 (“Nikon”, Japan). Для фіксації зображення використовували відеокамеру для мікроскопа (DCM310).

Інтенсивність флюоресценції DCF виражали в умовних одиницях (у.о.). Для аналізу й обробки зображень використовували програму ImageJ 1.4.3.67 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.18. Отримання лізатів лейкоцитів

Лізис лейкоцитів проводили буфером такого складу: 25 мМ трис-HCl (pH 7,5), 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ ЕДТА, 0,1% тритон Х-100 з додаванням коктейлю інгібіторів протеаз (3751.1, “CarlRoth”, Germany). Свіжоприготовлений буфер додавали до лейкоцитів у співвідношенні 600 мкл буферу на 10 млн лейкоцитів. Лізис проводили впродовж 20 хв на льодяній бані. Лізати центрифугували 10 хв за

8 000 об/хв та температури 4 °С і проводили забір супернатанту, який використовували для подальших досліджень.

2.19. Визначення концентрації білка за методом Лоурі

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [136]. Результат виражали у мг білка на мл зразка.

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

2.20.1. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Принцип методу ґрунтується на активації ПОЛ двовалентними іонами феруму до рівня, який реєструється спектрофотометрично [248]. За високої температури в кислому середовищі МДА реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання за $\lambda = 532$ нм.

У пробірку до 0,2 мл плазми крові/лізату лейкоцитів додавали 3 мл 10 мМ К,Na-фосфатного буферу, приготовленого на 125 мМ розчині KCl (pH 7,4). Для індукції ПОЛ додавали 0,5 мл 1 мМ $KMnO_4$ та двічі, з інтервалом у 10 хв, по 0,5 мл 10 мМ $FeSO_4$. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20% ТХО. Осад відцентрифуговували за 3000 об/хв впродовж 15 хв. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1 н. HCl і 1 мл 0,7% ТБК та інкубували на водяній бані за температури 100 °С впродовж 20 хв. Вимірювання екстинкції проводили за довжини хвилі $\lambda = 532$ нм.

Обрахунок проводили за формулою:

$$\text{ТБК – активні продукти} = \frac{E \cdot V_1 \cdot n}{\varepsilon \cdot V_2 \cdot l}$$

де, E – екстинкція дослідної проби; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу МДА з ТБК, 156000 $М^{-1} \times см^{-1}$; V_1 – об’єм зразка, мл; V_2 – об’єм супернатанту, мл; n – розведення зразка; l – довжина світлового потоку, см.

Отримані результати виражали в нмоль × $мл^{-1}$ плазми та в пмолях/млн. лейкоцитів.

2.20.2. Визначення вмісту карбонільних груп білків

В процесі окиснювальної модифікації білків крові в бічних ланцюгах 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 [43]. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєструються за довжини хвилі λ = 370 нм, а основного характеру – за λ = 430 нм.

У пробірки вносили 0,8 мл 0,9% розчину NaCl, 0,2 мл плазми крові/лізату лейкоцитів, 1 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2 н. розчині HCl і 1 мл 10% розчину ТХО. У контрольну пробу замість 2,4-ДНФГ додавали 1 мл 2 н. розчину HCl. Проби інкубували 1 год за температури 37 °С, а після завершення інкубації центрифугували 10 хв за 3000 об/хв. Осад промивали тричі 5% розчином ТХО, після того, до осаду додавали 5 мл 8 М розчину сечовини, інкубували 5 хв у киплячій водяній бані до повного розчинення.

Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували за довжин хвиль λ = 370 нм та λ = 430 нм. Вміст фенілгідразонів нейтрального характеру (370 нм) розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції ε = 22,000 $М^{-1} \times см^{-1}$, основного характеру (430 нм) – ε = 16,800 $М^{-1} \times см^{-1}$ та виражали в мкмоль × $г^{-1}$ білка.

2.20.3. Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації білків

Кінцеві продукти оксидації білків (AOPPs) – це дитирозиновмісні білкові сполуки, що утворюються за оксидативного стресу внаслідок реакції хлорвмісних окисників, таких як хлораміни і гіпохлоритна кислота, з білками. Визначення AOPPs ґрунтується на спектрофотометричному детектуванні утворених продуктів [101; 216].

У лунки планшетки вносили 200 мкл плазми крові, розведеної ЗФР (pH 7,4), або лізату лейкоцитів. До зразка додавали 10 мкл 1,16 М розчину калій йодиду (KI) і 20 мкл оцтової кислоти. У холосту пробу замість зразка вносили 200 мкл ЗФР. Вимірювання екстинкції проводили за довжини хвилі λ = 340 нм проти холостої

проби. Для побудови калібрувального графіку використовували стандартний розчин хлораміну-Т (0–100 мкмоль/л). Вміст кінцевих продуктів оксидації білків виражали в мкмоль × $г^{-1}$ білка.

2.21. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікації білків

Визначення вмісту AGEs проводили згідно методу Kalousova et al. [101]. У пробірки вносили плазму крові, розведену ЗФР (pH 7,4), або лізат лейкоцитів. Як стандарт використовували розчин BSA (1 мг/мл в 0,1 н. NaOH), значення якого приймали як одну одиницю флюоресценції (AU). Вміст AGEs визначали вимірюванням флюоресценції за довжини хвилі збудження λ = 370 нм і довжині хвилі випромінювання λ = 440 нм за допомогою спектрофлюориметра (Quantech Wide Band Filter Fluorometer, FM109530-33, Thermo Fisher Scientific). Вміст AGEs виражали в AU × $мг^{-1}$ білка.

2.22. Визначення вмісту відновленого глутатіону

Визначення вмісту відновленого глутатіону ґрунтується на реакції сульфгідрильних груп з реактивом Елмана (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота) [181]. До 0,5 мл лізату лейкоцитів додавали 3,5 мл 0,36 н. розчину H_2SO_4, перемішували й інкубували 10 хв для осадження білків. Після цього додавали 1 мл 10% розчину $NaWO_4$. Проби центрифугували за 10000 g впродовж 10 хв. Супернатант (1 мл) переносили в пробірки, додавали 0,75 мл 2 М трис-HCl буферу (pH 8,4), 0,5 мл ацетону і 0,25 мл реактиву Елмана. Після розвитку забарвлення визначали показник екстинкції на спектрофотометрі проти дистильованої води (λ = 412 нм).

Вміст відновленого глутатіону розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції ε = 13,600 $М^{-1}$ × $см^{-1}$ та виражали в нмоль × $мг^{-1}$ білка.

2.23. Визначення активності про- та антиоксидантних ензимів

2.23.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Визначення активності СОД ґрунтується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, які утворюються у

результаті взаємодії відновленого НАД$^+$ з феназинметасульфатом в аеробних умовах [250]. У результаті цієї реакції нітросиній тетразолій відновлюється з утворенням гідразинтетразолію (нітроформазану). За наявності СОД відсоток відновлення нітросинього тетразолію знижується. Активність ферменту оцінювали за кількістю утвореного нітроформазану.

До 0,1 мл лізату лейкоцитів додавали 1,5 мл інкубаційної суміші, що містила 39 мМ ЕДТА-Na, 114 мМ нітротетразолій синій (мета-форма), 54 мМ феназинметасульфат, розчинені у 0,15 М фосфатному буфері (pH 7,8). У холосту пробу замість супернатанту вносили дистильовану воду. Реакцію запускали додаванням 0,05 мл розчину НАДН + Н$^+$ (152 мг НАДН + Н$^+$ в 100 мл трис-ЕДТА буферу, pH 8,0). Через 10 хв проводили вимірювання екстинкції за довжини хвилі λ = 540 нм проти води у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Розрахунки проводили за формулою:

$$[A]= \frac{E_{хол} - E_{досл}}{E_{хол}} \bullet 100\% \quad \text{[\% блокування формазану]},$$

де $E_{хол}$ – екстинкція холостої проби; $E_{досл}$ – екстинкція дослідної проби.

Активність СОД 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.

2.23.2. Визначення активності каталази

Принцип методу ґрунтується на здатності H_2O_2 утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [236]. Інтенсивність забарвлення перекисних сполук молібдену залежить від кількості H_2O_2 в розчині, тобто від активності каталази в пробі.

Каталазну реакцію запускали додаванням лізату лейкоцитів у 0,05 М трис-HCl буфері (pH 7,8) до 0,03% розчину H_2O_2. Реакцію у дослідній пробі зупиняли через 10 хв додаванням 4% розчину амоній молібдату. Холоста проба містила одразу розчин амоній молібдату, H_2O_2 та лізат лейкоцитів. Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично за довжини хвилі λ=410 нм.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l} \text{ (мкмоль } H_2O_2 \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг}^{-1}\text{білка)},$$

де ΔE – різниця екстинкції холостої та дослідної проб; V – загальний об'єм суміші у кюветі; n – розведення лізату; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу H_2O_2 з амоній молібдатом, ε = 22,2 см^2/мкмоль; C – концентрація білка у досліджуваній пробі, мг·× мл$^{-1}$; t – час реакції; α – об'єм лізату; l – довжина оптичного шляху.

2.23.3. Визначення активності глутатіонпероксидази

Активність глутатіонпероксидази вимірюється за швидкістю окиснення відновленого глутатіону за наявності гідропероксиду трет-бутилу. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з реактивом Еллмана (0,01 М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі) з утворенням кольорового продукту – тіонітрофенільного аніону [241]. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з реактивом Еллмана.

У пробірку вносили 0,1 мл лізату лейкоцитів та 0,83 мл 0,1 М трис-HCl буферу (pH 8,5), що містив 6 мМ ЕДТА, 12 мМ NaN_3 і 4,8 мМ GSH (GSH додавали безпосередньо перед дослідом) та інкубували за температури 37 °С впродовж 10 хв. До проби додавали 0,07 мл 20 мМ гідропероксиду трет-бутилу й інкубували 5 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл холодного 20% розчину ТХО. Для приготування контрольної проби додавали всі перелічені вище реагенти, однак лізат лейкоцитів вносили після додавання ТХО та трис-HCl буферу, який містив ЕДТА, NaN_3, GSH та трет-бутил. Пробу з доданою ТХО центрифугували за 10000 g впродовж 10 хв. До 2 мл 0,1 М трис-HCl буфера (pH 8,5) додавали 0,02 мл супернатанту (V_{super}) і 0,02 мл реактиву Еллмана. Через 5 хв проби фотометрували за довжини хвилі λ = 412 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Активність глутатіонпероксидази розраховували за формулою:

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

де, ΔE – різниця екстинкції холостої та дослідної проб; a – об'єм трис-HCl буфера, гідропероксиду трет-бутилу, розчину ТХО; b – об'єм супернатанту, трис-HCl буферу та реактиву Еллмана; ε – молярний коефіцієнт екстинкції тіонітрофенільного аніона, ε = 11400 $М^{-1} \times см^{-1}$; 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 / хв × мг білка.

2.23.4. Визначення активності глутатіонредуктази

Принцип методу ґрунтується на зменшенні вмісту НАДФН + H^+ внаслідок глутатіонредуктазної реакції у дослідній пробі [81].

Інкубаційна суміш містила 1,8 мл 0,01 М K,Na-фосфатного буферу (pH 7,4), 0,1 мл 0,008 М розчину окисленого глутатіону (приготованого на 0,01 н. розчині NaOH) і 0,1 мл 0,002 М НАДФН + H^+, приготованого на 1% розчині $NaHCO_3$. Реакцію проводили в кюветі спектрофотометра за температури 37 °C і запускали додаванням 0,05 мл лізату лейкоцитів. Для розрахунку використовували зменшення оптичної густини за 10 хв.

Розрахунок ферментативної активності проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l},$$

де, ΔE – різниця екстинкції за час проходження реакції; V – об'єм інкубаційного середовища, мл; ε – молярний коефіцієнт екстинкції для НАДФН + H^+, t – час проходження реакції, хв; ε = 6220 $М^{-1} \times см^{-1}$; C – концентрація білка, мг/мл; α – об'єм лізату лейкоцитів, який вносили у кювету; l – довжина оптичного шляху.

Глутатіонредуктазну активність виражали в нмоль / хв × мг білка.

2.23.5. Визначення активності мієлопероксидази у лейкоцитах периферичної крові

Визначення активності мієлопероксидази у лейкоцитах периферичної крові проводили згідно методу, описаного Krawisz et al. [119].

Готували інкубаційну суміш, яка містила: 10 мл робочого 50 мМ фосфатного буферу (pH 5,4–6,0), 1,67 мг *о*-діанізидину та 3,5 мкл 3% розчину H_2O_2. Реакцію

запускали додаванням 70 мкл лізату лейкоцитів (або 10 мкл плазми крові) до 230 мкл інкубаційної суміші, ресуспендували та негайно вимірювали оптичну густину досліджуваних проб за довжини хвилі 450 нм проти холостої проби. Холоста проба замість зразка містила відповідний об'єм ЗФР. Після вимірювання екстинкції суміш інкубували за температури 37 °С впродовж 10 хв і знову фотометрували.

Розрахунок активності мієлопероксидази проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l},$$

де ΔE – різниця оптичних щільностей ($E_{10\ хв} - E_{0\ хв}$); V – загальний об'єм проби, мл; t – час інкубації, хв; α – об'єм внесеного зразка, мл; l – довжина світлового потоку, см; c – концентрація білка, мг/мл; ε – коефіцієнт молярної екстинкції *о*-діанізидину, $\varepsilon = 11300\ М^{-1} \times см^{-1}$.

Отримані результати виражали у нмоль H_2O_2 / хв на 1 мг білка.

2.24. Визначення рівня АТФ в лейкоцитах крові

Рівень АТФ у лейкоцитах визначали за допомогою набору (Sigma MAK190; Sigma-Aldrich). Принцип методу ґрунтується на реакції фосфорилювання гліцеролу з утворенням продукту, концентрація якого пропорційна вмісту АТФ у досліджуваному зразку.

До 50 мкл лізату лейкоцитів додавали 50 мкл реакційної суміші (компоненти реакційної суміші змішували згідно протоколу виробника для досліджуваної та холостої проб) та інкубували 30 хв за кімнатної температури у темряві. Абсорбцію дослідних зразків вимірювали на планшетному рідері за довжини хвилі λ = 570 нм проти холостих проб.

Вміст АТФ розраховували на основі калібрувальної кривої, яку будували з використанням стандартного розчину АТФ, що входив до набору. Отримані результати виражали у нг/млн лейкоцитів.

2.25. Дослідження інтенсивності поглинання флюоресцентного аналога глюкози лейкоцитами

Аналог глюкози – флюоресцентно мічена 2-(N-(7-нітробенз-2-оксо-1,3-діазол-4-іл)аміно)-2-дезоксиглюкоза (2-NBDG) проникає в живі клітини через транспортер глюкози. Флюоресценція, генерована 2-NBDG, пропорційна інтенсивності поглинутої глюкози клітинами [160; 177].

У пробірках готували суспензію виділених лейкоцитів (500 тис. клітин) у 0,1 М Кребс-Рінгер фосфатному буфері (pH 7,2–7,4). До лейкоцитів додавали 2-NBDG (кінцева концентрація 500 мкМ) та інкубували 30 хв за температури 37 °С у темряві. Після інкубації зразки центрифугували, відмивали 2 рази холодним ЗФР, наносили на предметне скло та негайно аналізували. Для аналізу використовували інвертований мікроскоп Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74 (Міжуніверситетський центр колективного користування клітинної біології та біоенергетики, Львів). Флюоресцентні фотографії поглинутої клітинами глюкози оцифровували за допомогою програми ImageJ.

Паралельно проводили аналіз за допомогою протокового цитометра BD FACScan (Becton Dickinson, USA).

2.26. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі [70; 220]

Приготовані зразки з концентрацією білка в пробі 50 мкг розводили 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) у співвідношенні 1 : 1 і проварювали за температури 70 °С впродовж 10 хв.

Протеїни розділяли електрофоретично в блоках поліакриламідного гелю з додаванням натрій додецилсульфату (SDS). 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. Амоній персульфат (APS) – 10% розчин.

5. Натрій додецилсульфату (SDS) – 10% розчин.
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 10% розділяючий (3,28 мл H_2O; 2,64 мл “АА”; 2 мл “А”; 0,08 мл SDS; 0,04 мл APS; 0,004 мл ТЕМЕД) та 4% концентруючий (1,83 мл H_2O; 0,39 мл “АА”; 0,75 мл “Б”; 0,03 мл SDS; 0,03 мл APS; 0,003 мл ТЕМЕД) гелі. В електрофоретичну установку заливали буфер для електрофорезу. Електрофорез проводили за сили струму 15 мА, напруги 200 В та потужності 50 Вт на одну пластину. Після переходу проб з концентруючого гелю у розділяючий, силу струму збільшували до 25 мА на одну пластину.

2.27. Імуноблотинг протеїнів [70; 220]

Отримані розділені протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля за сили струму 250 мА, в буфері, що містив 25 мМ трис-HCl (pH 8,3), 20% метанол та 192 мМ гліцин, впродовж 2 год. Контроль кількості внесеного білка у лунку та перенесення їх на мембрану здійснювали фарбуванням Понсо й аналізували за допомогою програми GelPro 3.1. Вільні центри зв’язування на мембрані блокували впродовж 1 год за кімнатної температури 5% розчином сухого знежиреного молока в ЗФР, pH 7,4 з 0,05% твін-20. Після блокування мембрану інкубували з первинними антитілами до RAGE (16346-1-AP, Proteintech, США), розведеними у блокуючому буфері у співвідношенні 1 : 1000, упродовж ночі. Далі мембрану відмивали від залишків антитіл 3 рази по 5 хв у TBST (20 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0,05% твін-20, pH 7,4). Як другі антитіла використовували anti-rabbit IgG (A0545, Sigma-Aldrich, США), кон’юговані з пероксидазою хрону, розведені у блокуючому буфері у співвідношенні 1:5000. Інкубацію з другими антитілами проводили впродовж 1 год за кімнатної температури, після чого мембрану відмивали 3 рази по 5 хв у TBST. 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.

2.28. Імуноцитохімічна детекція рецептора до кінцевих продуктів глікації на мембрані лейкоцитів

Для виявлення та візуалізації повнорозмірного рецептора до кінцевих продуктів глікації (flRAGE) на мембрані лейкоцитів використовували непрямий імунопероксидазний метод [46; 234]. Лейкоцити, нанесені на предметне скло (70 тис. клітин у 70 мкл ЗФР), фіксували у розчині метанолу за температурі –4 °С впродовж 10 хв та 2 хв в охолодженому ацетоні. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,1% розчином тритону Х-100 в ЗФР. Для блокування ендогенної клітинної пероксидази препарати інкубували з 0,3% розчином H_2O_2 (5 хв). Блокування вільних центрів зв’язування здійснювали шляхом інкубування клітин з 1% розчином BSA в ЗФР (“Sigma-Aldrich“, США) впродовж 1 год. Для детекції рецептора до кінцевих продуктів глікації клітини інкубували з первинними антитілами до RAGE (16346-1-AP, Proteintech, США), розведеними у блокуючому розчині (1 : 200) впродовж 2 год. Зразки тричі відмивали в ЗФР й інкубували з вторинними антитілами anti-rabbit IgG (A0545, Sigma-Aldrich, США), розведеними у блокуючому розчині (1 : 500) впродовж 1 год за кімнатної температури. Блокування й інкубування з антитілами проводили у вологій камері. Після відмивання за описаною вище схемою, кольорову реакцію для детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3,3'-діамінобензидину (ДАБ) та 0,015% H_2O_2. Аналіз вмісту flRAGE у мембрані досліджуваних клітин здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням ×40 об’єктиву інвертованого мікроскопа Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74. Негативними контролями специфічності зв’язування слугували клітини без використання як перших, так і других антитіл.

Оцінку зв’язування антитіл з flRAGE лейкоцитів здійснювали за пероксидазною реакцією, яку виявляли за коричневими відкладеннями продуктів окисної полімеризації ДАБ у режимі оцифрування мікрофотографій лейкоцитів. На препараті диференціювали 500 досліджуваних клітин. Інтенсивність зв’язування

антитіл оцінювали як “+” – RAGE-позитивні та “–” – RAGE-негативні клітини. Суму $RAGE^+$-лейкоцитів і $RAGE^-$-лейкоцитів приймали за 100% та за пропорцією розраховували відсотковий вміст RAGE-позитивних ($RAGE^+$) лейкоцитів.

2.29. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2007 та GraphPad Prism 5.0. Результати досліджень обробляли статистично з обчисленням середніх арифметичних величин (M) та стандартної похибки середнього (m). Вірогідність статистичної значущості відмінностей між груповими середніми оцінювали на основі однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Попарне порівняння даних проводили, використовуючи двовибірковий t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок або, критерій Тьюкі. Вірогідними вважали значення за $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Характеристика кількісного та якісного складу екстрактів плодів дерену справжнього

Екстракти *Cornus mas* L. були приготовані з дозрілих плодів двох сортів: “Янтарний” (жовтий колір стиглих плодів) та “Подольський” (червоний колір стиглих плодів). Результати якісної та кількісної ідентифікації сполук в складі екстрактів дерену справжнього представлені в таблиці 3.1. Сполуки були ідентифіковані за часом їх утримання (англ. retention time (t_R) – час, потрібний для повного проходження аналіту через хроматографічну систему за певних умов), порядком елюції, спектрами окремих піків (UV/Vis, MS, MS/MS) та порівнянням з літературними даними. У своєму дослідженні ми визначили 29 основних сполук з двох груп: 8 іридоїдів та 21 фенольну сполуку. Серед восьми іридоїдів було виявлено три ізомери логанової кислоти, сверозид, логанін і секоксилоганін та два ізомери корнузиду. Ці вісім іридоїдів аналізували в режимі як позитивного, так і негативного іона до і після фрагментації.

Таблиця 3.1

Ідентифікація (мг/100 г сухої маси) основних сполук у складі екстрактів жовтих (ЖД) і червоних (ЧД) плодів дерену справжнього методами UPLC-ESI-qTOF-MS/MS та HPLC-PDA

№ піку	***R* (хв)**	**Сполуки**	**UV λ_{max} (нм)**	**$[M–H]^–$ /$[M+H]^+$ (*m/z*)**	**Інші іони (*m/z*)**	**Вміст (мг на 100 г сухої маси)**	
						ЖД	ЧД
				Іридоїди			
1	4.9	Логанова кислота	246	375 (377+)	213 (215+)	13679,6±82,9	10247,4±37,5
2	5.2	Логанова кислота (ізомер 1)	245	375 (377+)	213 (215+)	1266,46±13,8	572,34±7,97
3	6.1	Логанова кислота (ізомер 2)	245	375 (377+)	213 (215+)	520,15±1,05	468,68±5,17
4	8.7	Сферозид	245	403 $[M–H+46]^–$ (359+)	195 (197+)	609,88±6,99	548,12±3,62

5	8.7	Логанін	245	435 [M–H+46]⁻ (391+)	227 (229+)	982,95±44,74	Слідова кількість
6	10.3	Секоксилоганін	245	403 (405+)	371/233 (235+)	434,09±15,73	238,00±4,10
7	16.1	Корнузид 1	245/273	541 (543+)	169	2731,7±29,4	1930,2±10,2
8	16.5	Корнузид 2	245/273	541 (543+)	169	78,90±2,50	64,22±1,70
		Всього				20303,75	14068,98
				Антоціани			
9	6.3	Дельфінідин 3-*O*-галактозид	524	463+	303+	nd	46,5±4,94
10	7.6	Ціанідин 3-*O*-галактозид	515	449+	287+	nd	759,2±0,94
11	8.3	Ціанідин 3-*O*-робінобіозид	516	595+	287+	nd	223,2±2,34
12	8.8	Пеларгонідин 3-*O*-галактозид	501	433+	271+	nd	1570,0±3,23
13	9.5	Пеларгонідин 3-*O*-робінобіозид	501	579+	271+	nd	249,3±2,02
14	12.6	Ціанідин	523	287+	–	nd	84,7±31,75
15	15.1	Пеларгонідин	509	271+	–	nd	134,0±39,29
		Всього					3066,80
				Фенольні кислоти			
16	4.1	Кофеїлгексозид 1	326	341	179	228,56±2,41	123,06±2,45
17	4.6	*p*- Кумароїлхінна кислота 1	316	337	163	92,66±0,43	51,09±0,30
18	5.8	Кофеїлхінна кислота 1	324	353	191	834,71±13,52	585,53±3,26
19	5.8	Кавова кислота	324	179	–	116,17±0,86	91,71±0,44
20	7.6	Кофеїлхінна кислота 2	323	353	191	14,48±1,20	Слідова кількість
21	7.9	*p*-Кумаринова кислота	309	163	–	74,20±1,73	8,58±0,20
22	8.3	*p*- Кумароїлхінна кислота 2	313	337	191/163	702,02±12,77	301,86±2,56
23	10.0	*p*- Кумароїлхінна кислота 3	312	337	191/163	48,22±2,24	21,66±0,17
24	12.3	Еллагова кислота	254/362	301	–	46,15±3,44	102,03±1,10
		Всього				2157,17	1285,52

				Флавоноли			
25	12.9	Кверцетин 3-*O*-галактозид	353	463	301	39,84±0,45	55,32±0,38
26	13.2	Кверцетин 3-*O*-глюкуронід	354	477	301	483,12±3,38	380,68±0,95
27	13.7	Кверцетин 3-*O*-глюкозид	353	463	301	30,43±0,32	20,00±0,07
28	14.8	Кемпферол 3-*O*-галактозид	348	447	285	nd	225,31±1,48
29	15.6	Кемпферол 3-*O*-глюкуронід	351	461	285	nd	32,57±0,95
		Всього				553,38	713,87

Примітка: nd, not detected – не ідентифіковано

Встановлено, що сполуки 1, 2 та 3 є ізомерами логанової кислоти. Вони мали псевдомолекулярний іон за m / z 375 $[M - H]^-$ та фрагментний іон за 213 $[M - H]^-$. Сполуки 4 та 5 траплялись у формі аддуктів за m / z 403 $[M - H + 46]^-$ та 435 $[M - H + 46]^-$, відповідно, частіше ніж у вигляді молекулярних іонів за m / z 357 та 389, відповідно. Ці речовини були ідентифіковані як сверозид і логанін. Сполука 6 сформувала $[M - H]^-$ іон за m / z 403 і $[M + H]^+$ та фрагментарні іони за m / z 371 та 233 у негативному режимі. Ця сполука була ідентифікована як секоксилоганін. Сполуки 7 та 8 демонстрували псевдомолекулярні іони за m / z 541 $[M - H]^-$ та фрагментовані іони за m / z 169 і були, приблизно, визначені як ізомери корнузиду. Результати ідентифікації чотирьох з восьми виявлених іридоїдів у плодах дерену справжнього були раніше описані Kucharska et al. [120] та Deng et al. [44], тоді як два ізомери логанової кислоти, секоксилоганін і корнузид 2, були вперше ідентифіковані в очищених екстрактах плодів дерену справжнього.

Фенольні сполуки, виявлені в складі екстрактів, можна класифікувати на три групи: антоціани, фенольні кислоти та флавоноли. Антоціани були ідентифіковані виключно в екстракті червоних плодів дерену. Ці сполуки аналізували в позитивному режимі до і після фрагментації. Серед семи антоціанів виявлено три моноглюкозиди (дельфінідин 3-O-галактозид з $[M + H]^+$ за m / z 463 та $[M + H - 162]^+$ за m / z 303; ціанідин 3-O-галактозид з $[M + H]^+$ за m / z 449 та $[M + H - 162]^+$ за m / z 287, пеларгонідин 3-O-галактозид з $[M + H]^+$ за m / z 433 та $[M + H - 162]^+$ за

m / z 271), два диглюкозиди (ціанідин 3-О-робінобіозид з $[M + H]^+$ за m / z 595 та $[M + H - 308]^+$ за m / z 287; пеларгонідин 3-О-робінобіозид з $[M + H]^+$ за m / z 579 та $[M + H - 308]^+$ за m / z 271) та два аглікони (ціанідин з $[M + H]^+$ за m / z 287, пеларгонідин з $[M + H]^+$ за m / z 271). Аглікани антоціанів можуть формуватися після відщеплення цукрів у результаті гідролізу під впливом різних факторів. У цьому разі вони утворились на етапі отримання та очищення екстракту.

Серед фенольних кислот було визначено вісім гідроксикоричних кислот та одну гідроксибензойну кислоту. У першій групі ідентифіковано р-кумарову кислоту з $[M - H]^-$ за m / z 163 та три ізомери р-кумароїлхінної кислоти з $[M - H]^-$ за m / z 337 та фрагментовані іони за m / z 191 та 163. Крім того, виявлено псевдомолекулярний іон за m / z 179, що відповідає кавовій кислоті, два псевдомолекулярних іона – за m / z 353 і фрагментований іон – за 191, що відповідає двом ізомерам кофеїлхінної кислоти, і один псевдомолекулярний іон – за m / z 341, що відповідає кофеїлгексозиду. Сполуку 24 було ідентифіковано як еллагова кислота з псевдомолекулярним іоном за m / z 301 $[M - H]^-$ та з УФ-спектром за 254 та 362 нм.

Серед флавонолів три похідні кверцетину були ідентифіковані як у екстрактах червоних, так і жовтих плодів дерену, а два похідні кемпферолу – лише у екстракті червоних плодів. Ці сполуки аналізували в негативних режимах до та після фрагментації. Сполуки 25, 26 і 27 демонстрували псевдомолекулярні іони при m / z 463, 477 і 463, відповідно, з тим самим фрагментованим іоном за m / z 301, який відповідав молекулярному іону мотиву кверцетину після втрати галактози, глюкуроніду та глюкози відповідно. Сполуки 28 та 29 мали псевдомолекулярні іони за m / z 447 та 461 та той самий фрагмент-іон за m / z 285, який відповідав молекулярному іону залишку кемпферолу після втрати галактози та глюкуроніду, відповідно. Ідентифікація кверцетину 3-О-галактозиду, кверцетину 3-О-глюкуроніду, кверцетину 3-О-глюкозиду та кемпферолу 3-О-галактозиду узгоджується з літературними даними [44; 167]. У своїх дослідженнях ці автори виділили ще три похідні кверцетину та одне похідне аромадендрину, які не були виявлені в наших дослідженнях.

Загальна кількість іридоїдів сильно варіювала в екстрактах жовтих і червоних плодів *Cornus mas* L. і коливалась від 20,3 г на 100 г до 14,1 г на 100 г сухої маси, відповідно (табл. 3.1). Натомість, антоціани були виявлені лише в складі червоних плодів і становили 3,1 г на 100 г сухої маси екстракту.

В аналізованих екстрактах ми ідентифікували більше іридоїдів та в 9 разів більше антоціанів, ніж у неочищених екстрактах найкращого сорту дерену справжнього [120].

Оскільки іридоїди, зокрема логанова кислота та її ізомери, становили значну частку складу екстрактів як червоних, так і жовтих плодів дерену справжнього, тому було вирішено дослідити біологічні ефекти логанової кислоти, отриманої з жовтих плодів дерену. Екстракт “Логанова кислота” готували з дозрілих жовтих плодів *Cornus mas* L. сортів “Янтарний” та “Флава”. Результати ідентифікації якісного складу (мг/100 г сухої маси) цього екстракту представлені в табл. 3.2. Загалом ми визначили одну основну сполуку у вигляді трьох ізомерів із групи іридоїдів та додатково одну сполуку в 2 ізомерних формах із групи фенольних кислот.

Під час аналізу якісного складу даного екстракту серед іридоїдів було виділено три ізомери логанової кислоти з УФ-спектром за 246 нм. Ці ізомери мали псевдомолекулярні іони за m / z 375 $[M – H]^–$ і фрагментний іон за m / z 213 $[M – H – 162]^–$. Другою сполукою у досліджуваному екстракті була кафтарова кислота у вигляді двох ізомерів з УФ-спектрами за 327 та 328 нм. Ці сполуки дали $[M – H]^–$ іон за m / z 311 і $[M – H – 132]^–$ іон за m / z 179 після втрати фрагменту винної кислоти (132 Да), а також фрагментні іони за m / z 149 (винна кислота) та за m / z 135, отримані в результаті декарбоксилювання кавової кислоти.

Таблиця 3.2

Ідентифікація сполук (мг / 100 г сухої маси) екстракту “Логанова кислота” з жовтих плодів *Cornus mas* L. методами LC-MS та HPLC-PDA

№ піку	Сполуки	UV λ_{max} (нм)	$[M – H]^-$ (*m/z*)	Інші іони (*m/z*)	Вміст (мг на 100 г сухої маси)
			Іридоїди		
1	Логанова кислота 1	246	375	213	183,1 ± 27,4
2	Логанова кислота 2[a]	246	375	213	70 228,5 ± 548,6
3	Логанова кислота 3	246	375	213	3581,7 ± 73,1
	Всього				73 993,3
			Фенольні кислоти		
4	Кафтарова кислота 1	327	179/311	149/135	721,7 ± 10,1
5	Кафтарова кислота 2[a]	328	179/311	149/135	1110,2 ± 20,0
	Всього				1831,9

Примітка: [a] – сполуки, ідентифіковані порівнянням часу утримання, абсорбції та мас-спектру з комерційними стандартами

Кількість ізомерів логанової кислоти становило 97,6% від загальної кількості біоактивних сполук у очищеному екстракті. Вміст ізомерів логанової кислоти був, приблизно, в 5 та 7 разів більшим, ніж у екстрактах жовтих і червоних плодів дерену, відповідно. Крім того, кількість ізомерів логанової кислоти у цьому екстракті була в 300 разів більшою, ніж у неочищених екстрактах свіжих плодів *Cornus mas* L. [120]. У зв’язку з тим, що досліджуваний екстракт має високу концентрацію логанової кислоти та його ізомерів (до 74 г / 100 г) та низьку концентрацію кафтарової кислоти (лише 1,8 г / 100 г), екстракт було названо “Логанова кислота”.

Підсумки до розділу

Ми проаналізували якісний та кількісний склад екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього. У своєму дослідженні ми визначили 29 основних сполук з двох груп: 8 іридоїдів і 21 фенольну сполуку. Встановлено, що екстракт жовтих плодів не містить антоціанів і похідних кемпферолу, проте виявлено більший вміст іридоїдів порівняно з екстрактом червоних плодів. Виявлено, що до складу екстракту “Логанова кислота”, окрім логанової кислоти та її ізомерів,

входить кафтарова кислота (2,4% від загального вмісту біоактивних сполук). Отримані та проаналізовані екстракти: “Червоний дерен”, “Жовтий дерен” і “Логанова кислота” було використано для дослідження їхніх біологічних ефектів *in vitro* та *in vivo*.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [50; 55].

3.2. Гіпоглікемічний потенціал екстрактів плодів *Cornus mas* L.

3.2.1. Дослідження ефекту екстрактів плодів *Cornus mas* L. на показники глікемічного контролю за експериментального цукрового діабету у щурів

Зростання рівня глюкози в крові – першочерговий критерій, що використовують для діагностики та моніторингу ЦД. Оскільки гіперглікемія є основною причиною та “пусковим механізмом” для розвитку подальших ускладнень, доцільним було проаналізувати цей показник. Зокрема, визначення концентрації глюкози є важливим для встановлення гіпоглікемічного ефекту досліджуваних речовин. Аналізуючи результати в останній день експерименту, встановили, що розвиток ЦД у тварин супроводжувався підвищенням рівня глюкози у 3,8 рази порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3.1*А*). За введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену відбувалось зниження концентрації глюкози на 49% та 42%, відповідно, порівняно з діабетом. Натомість екстракт логанової кислоти не проявляв цукрознижуючого ефекту (рис. 3.1*А*).

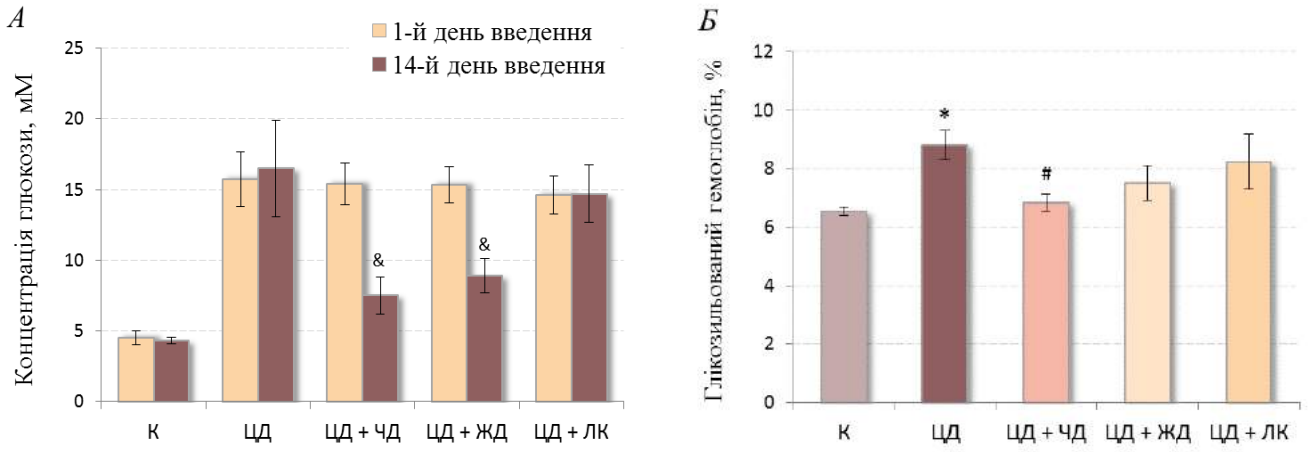


Рис. 3.1. Вплив екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти на рівень глюкози (*А*) та глікозильованого гемоглобіну (*Б*) у тварин зі стрептозотоцин-індукованим ЦД

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, P < 0,05, & – різниця вірогідна порівняно з 1-м днем введення, P < 0,05

Механізм гіпоглікемічної дії може бути зумовлений здатністю екстрактів підвищувати утилізацію глюкози периферичними тканинами в умовах

гіпоінсулінемії або перешкоджати поглинанню, перетравленню або абсорбції цукрів у тонкому кишечнику, що й призводить до зниження рівня глюкози в крові.

В останні роки визначення концентрації глюкози в цільній крові чи плазмі не використовують як самостійний показник для діагностики ЦД, оскільки на нього може впливати безліч чинників, таких як прийом і склад їжі, фізичні навантаження, час доби, стрес. Водночас, рівень глюкози в крові натще відображає показник лише на момент вимірювання, що не точно характеризує хронічну гіперглікемію і складний клінічний стан цієї патології [166]. Саме тому, для моніторингу перебігу захворювання використовують додатковий параметр – концентрацію глікозильованого гемоглобіну (HbA1*c*). Відомо, що приблизно 50% HbA1*c* утворюється в останню третину часу життя еритроцита [246]. Гемоглобін A1*c* формується внаслідок неферментативної реакції між α-аміногрупою валіну гемоглобіну A1 в еритроцитах та глюкозою і, таким чином, характеризує ступінь гіперглікемії впродовж тривалого часу, що відповідає життєвому циклу еритроцита. Перевагою даного показника є те, що вимірювання не вимагає попереднього голодування і на нього не впливає емоційний фактор [23].

Згідно результатів наших досліджень ми виявили зростання рівня HbA1*c* у 1,4 рази за експериментального ЦД у щурів (рис. 3.1*Б*). Незважаючи на те, що достовірне зниження рівня глюкози спостерігалось за введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього, достовірну зміну рівня глікозильованого гемоглобіну спричиняв лише екстракт червоних плодів (у 1,3 рази порівняно до тварин з ЦД, яким не вводили досліджувані екстракти, рис. 3.1*Б*).

Здатність екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього зумовлювати гіпоглікемічний ефект пов’язана з наявністю в їхньому складі біологічно активних сполук, зокрема антоціанів, фенольних кислот, флавонолів та іридоїдів (табл. 3.1).

Іншим біохімічним методом діагностики порушення вуглеводного обміну є тест толерантності до глюкози (ГТТ – глюкозотолерантного тесту). Цей підхід дає змогу перевірити динаміку і ступінь засвоєння вуглеводів в організмі та виявити можливі порушення цього процесу. Аналізуючи результати глікемічних кривих

(рис. 3.2*А*) виявилено, що у тварин з експериментальним діабетом максимальне підвищення концентрації глюкози в крові спостерігалося на 30 хв і починаючи з 60 хв з моменту глюкозного навантаження поступово поверталось до вихідних значень.

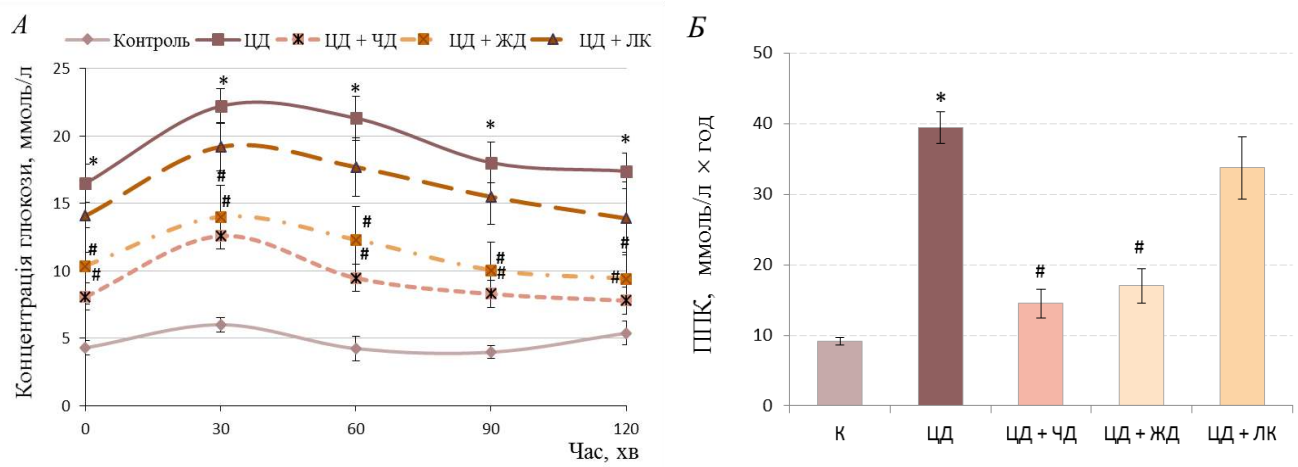


Рис. 3.2. Показники глюкозотолерантного тесту (*А*) та площі під глікемічними кривими (*Б*) у здорових щурів, тварин з експериментальним ЦД та за введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, P < 0,05

Після введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього щурам з діабетом рівень глюкози в крові теж досягав максимуму через 30 хв, а потім повільно знижувався до вихідних значень. Глікемічна крива тварин, яким вводили логанову кислоту була схожа на таку у тварин з діабетом. Глікемічну реакцію у разі проведення тесту толерантності до глюкози оцінювали за площею під глікемічними кривими (ППК). Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену сприяло зниженню даного показника в 3,0 та 2,1 раза, відповідно, порівняно з тваринами з діабетом (рис. 3.2*Б*). Натомість екстракт логанової кислоти за введення щурам діабетичної групи не спричиняв достовірних відмінностей інтегрального показника площі під глікемічними кривими.

3.2.2. Інгібування активності α-глюкозидази *in vitro* як можливий механізм гіпоглікемічної дії екстрактів плодів *Cornus mas* L.

α-Глюкозидаза є ключовим ферментом, що каталізує завершальний етап у процесі катаболізму вуглеводів до простих цукрів. Отже, зниження поглинання глюкози внаслідок пригнічення активності α-глюкозидази є однією із стратегій контролю рівня глюкози після їжі. Наші попередні дослідження антидіабетичного потенціалу плодів дерену справжнього *in vivo* дали змогу встановити здатність екстрактів червоних і жовтих плодів знижувати концентрацію глюкози у крові та позитивно впливати на динаміку засвоєння вуглеводів у разі проведення ГТТ у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом, але механізм їх дії є незрозумілим [50].

Аналізуючи одержані нами результати, було виявлено інгібувальний ефект екстрактів плодів дерену справжнього на активність *α*-глюкозидази *in vitro*. Екстракт червоних плодів дерену справжнього в концентрації 27,5 та 30 мкг/мл проявив вищу інгібувальну дію на активність *α*-глюкозидази порівняно з екстрактом жовтих плодів в цій самій концентрації (рис. 3.3*А* і *Б*).

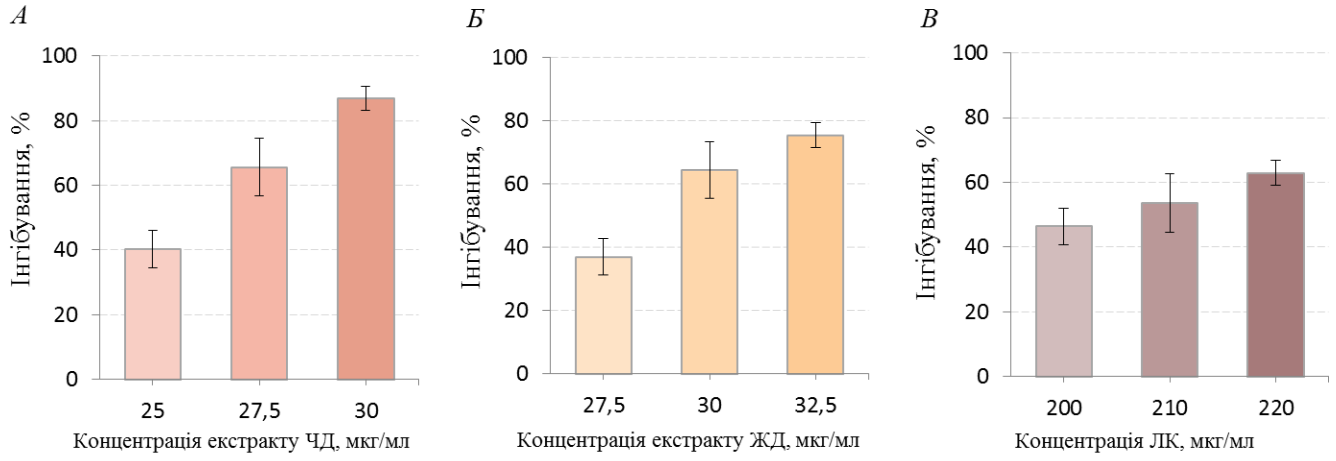


Рис. 3.3. Інгібувальний потенціал екстрактів червоних плодів (*А*), жовтих плодів (*Б*) дерену справжнього та логанової кислоти (*В*), встановлений для ферменту *α*-глюкозидази *Saccharomyces cerevisiae*

Інгібувальна активність екстракту і червоних, і жовтих плодів (рис. 3.3*В*) була достовірно сильнішою, ніж окремо екстрагованого іридоїдного глікозиду –

логанової кислоти та позитивного контролю – акарбози, яка в концентрації 5 мг/мл інгібувала активність α-глюкозидази на 44% (дані не представлено).

Інгібувальна дія логанової кислоти (IC_{50} 211,56 мкг/мл) на активність α-глюкозидази була в 8 та 7,5 раза слабшою порівняно з екстрактами червоних і жовтих плодів, відповідно (табл. 3.3). Отже, екстракт червоних плодів є ефективнішим інгібітором α-глюкозидази зі значенням IC_{50} 25,68 мкг/мл порівняно із екстрактом жовтих плодів та логановою кислотою.

Таблиця 3.3

Значення IC_{50} для екстрактів червоних плодів (ЧД), жовтих плодів (ЖД) дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК) для α-глюкозидази *Saccharomyces cerevisiae*

Екстракти	**IC_{50} (мкг/мл)**
ЧД	25,68 ± 0,37
ЖД	28,46 ± 0,36
ЛК	211,56 ± 3,84

Різний потенціал інгібування α-глюкозидази екстрактами червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логановою кислотою свідчить про залучення різних механізмів інгібування. Аналізуючи побудовані нами графіки Лайнуївера-Берка для пояснення механізму інгібування α-глюкозидази, виявили, що екстракти червоних і жовтих плодів проявляли змішаний тип інгібування цього ферменту (рис 3.4*А* і *Б*). Натомість логанова кислота виявилася неконкурентним інгібітором α-глюкозидази (рис. 3.4*В*).

Неконкурентний тип інгібування в координатах Лайнуївера-Берка вказує на те, що активні компоненти екстракту не конкурують із субстратом за зв’язування в активному центрі ферменту. Вони реагують з іншими, відмінними від активних центрів, ділянками на молекулі ферменту, що спричиняє пригнічення катаболізму складних вуглеводів до моносахаридів [153]. Змішаний тип інгібування подібний до неконкурентного, проте інгібітор може зв’язуватися з ферментом незалежно від того, чи фермент вже зв’язав субстрат, чи ні.

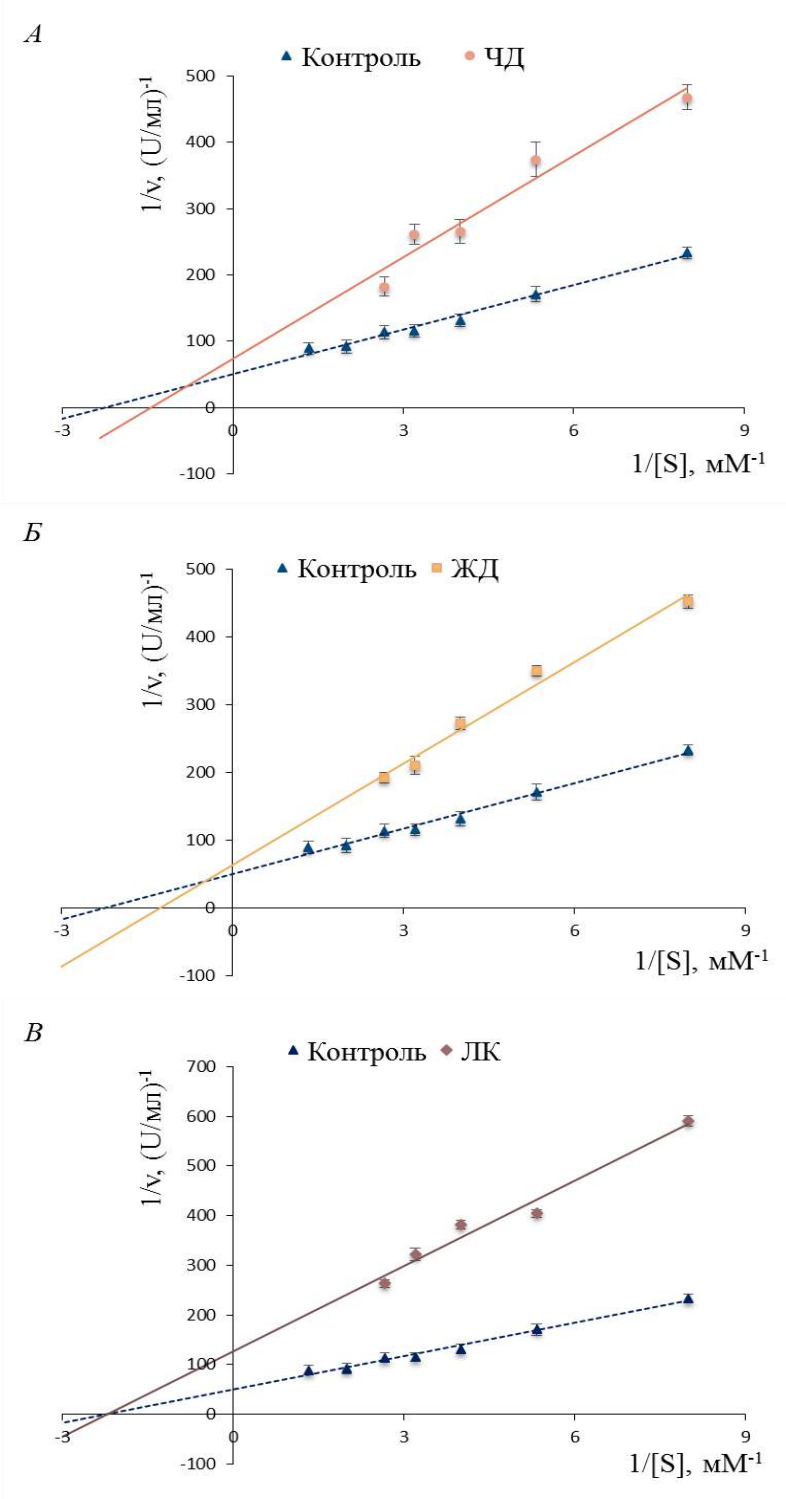


Рис. 3.4. Графік Лайнуївера-Берка для визначення механізму інгібування α-глюкозидази екстрактами червоних плодів (*А*), жовтих плодів (*Б*) дерену справжнього та логановою кислотою (*В*)

Отже, екстракти плодів *Cornus mas* L. є природними інгібіторами активності α-глюкозидази і можуть бути використані для контролю гіперглікемії після споживання їжі.

Підсумки до розділу

Дослідження гіпоглікемічного потенціалу плодів дерену справжнього у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом дало змогу вперше встановити антидіабетичний ефект екстрактів червоних і жовтих плодів, на що вказує зниження концентрації глюкози, глікозильованого гемоглобіну та інтегрального показника площі під глікемічними кривими. Екстракт логанової кислоти не проявляв гіпоглікемічного ефекту.

Виявлено інгібувальний ефект екстрактів плодів дерену справжнього на активність α-глюкозидази *in vitro*, як механізм гіпоглікемічної дії екстрактів. Встановлено, що екстракт червоних плодів виявляє найсильніші інгібувальні властивості серед досліджуваних екстрактів плодів дерену справжнього. Доведено, що екстракти жовтих і червоних плодів проявляли змішаний, а логанова кислота – неконкурентний тип інгібування α-глюкозидази.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [50; 55] та матеріалах конференцій [57; 208].

3.3. Вплив екстрактів плодів дерену справжнього на фізіологічні та гематологічні показники крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД

На наступному етапі дослідження було проаналізовано вплив екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти на окремі фізіологічні та цитологічні показники стану тварин.

Впродовж 14 днів експериментального періоду спостерігали фізіологічний приріст маси тіла контрольних тварин, який становив 33% (рис. 3.5). Натомість, середня маса щурів зі стрептозотоциновим ЦД знизилась на 9% порівняно до початкових показників (рис. 3.5). Втрата ваги за ЦД пояснюється посиленням катаболізму білків і жирів у тканинах діабетичних щурів, оскільки вуглеводи стають недоступні як джерело енергії в умовах гіпоінсулінемії [172].

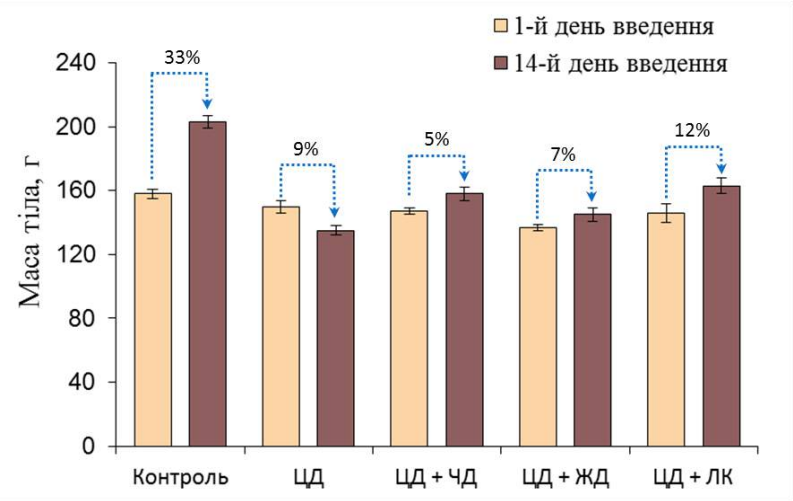


Рис. 3.5. Вплив екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти на масу тварин зі стрептозотоцин-індукованим ЦД

Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього призвело до достовірного зростання маси тіла у тварин з ЦД на 5% та 7%, відповідно (рис. 3.5). Логанова кислота теж спричиняла збільшення маси тіла на 12% у тварин з діабетом (рис. 3.5). Такі результати свідчать про позитивний вплив екстрактів на метаболічні процеси. Покращення глікемічного статусу за введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену може сприяти зменшенню втрати маси тіла тварин.

Навіть незначні зміни в організмі позначаються на показниках загального аналізу крові. Дослідження гематологічних параметрів дає змогу виявити зміни в

тканинах і органах, приховані патологічні процеси, провести диференціальну діагностику, оцінити функціональні можливості окремих органів і систем, проконтролювати позитивний чи негативний ефект від введення лікарських препаратів.

Згідно з одержаними результатами наших досліджень загальна кількість еритроцитів і концентрація гемоглобіну не зазнавали достовірних змін у тварин з ЦД порівняно з контрольними показниками. Однак спостерігалося достовірне зниження середнього вмісту гемоглобіну в одному еритроциті (англ. MCH – mean corpuscular hemoglobin) у 1,2 рази (табл. 3.4). Тривала гіперглікемія за діабету провокує порушення структури і функції нирок, які синтезують гормон еритропоезу – еритропоетин. Внаслідок цього може порушуватися дозрівання еритроцитів, що призводить до зменшення кількості гемоглобіну в одному еритроциті.

Таблиця 3.4

Гематологічні показники крові щурів у нормі, за ЦД та на фоні введення екстрактів червоних плодів (ЧД), жовтих плодів (ЖД) дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Показники	**Групи**				
	Контроль	ЦД	ЦД + ЧД	ЦД + ЖД	ЦД + ЛК
Кількість еритроцитів, 10^6 мкл$^{-1}$	5,93 ± 0,53	5,79 ± 0,54	6,05 ± 0,33	5,19 ± 0,35	5,99 ± 0,20
Гемоглобін, г%	12,30 ± 1,40	10,04 ± 0,35	10,04 ± 0,72	10,62 ± 0,88	14,86 ± 0,55$^{\#}$
Середній вміст гемоглобіну, пкг	21,60 ± 1,08	17,47 ± 0,60*	16,45 ± 0,74	20,45 ± 0,55$^{\#}$	24,87 ± 1,11$^{\#}$

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; $^{\#}$ – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Відомо, що MCH залежить від об’єму еритроцитів і ступеня їх насичення гемоглобіном. Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього тваринам з ЦД не спричиняло змін у загальній кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну, проте за введення щурам екстракту жовтих плодів дерену показник MCH підвищувався до значень контрольної групи (табл. 3.4). Загальна кількість

еритроцитів не зазнала суттєвих змін і у щурів, які отримували логанову кислоту, але концентрація гемоглобіну та МСН зростали на 38% та 40%, відповідно, порівняно з діабетичним контролем (табл. 3.4).

Нами також було проаналізовано розподіл еритроцитів за їх стійкістю до кислотного гемолітичного агента (рис. 3.6). Згідно отриманих результатів досліджень у контрольній групі тварин еритрограма характеризувалася піком гемолізу на 4 хв та поступовим повільним зниженням до нуля з 7 до 9 хв (рис. 3.6*А*). Для аналізу співвідношення різновікових популяцій еритроцитів використовували розподіл еритрограми на три сегменти: еритроцити зі зниженою резистентністю (сегмент еритрограми від 1,5 до 3,0 хв); функціонально зрілі еритроцити з помірною резистентністю (сегмент еритрограми від 3,5 до 4,5 хв) та молоді еритроцити з підвищеною резистентністю (сегмент еритрограми від 5,0 до 7,5 хв). У тварин контрольної групи популяція функціонально зрілих еритроцитів становила 70% всієї кількості гемолізованих клітин (рис. 3.6*Б*).

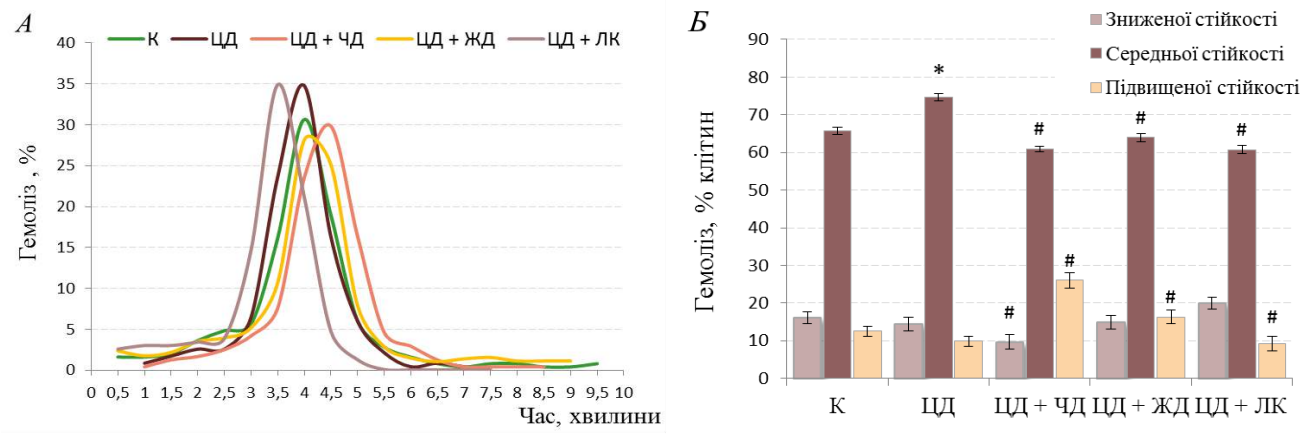


Рис. 3.6. Криві гемолізу еритроцитів за дії кислотного гемолітика (*А*) та розподіл клітин за стійкістю (*Б*) у нормі, за експериментального ЦД та введення екстрактів червоних плодів (ЧД), жовтих плодів (ЖД) дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

За ЦД нами виявлено зниження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика (рис. 3.6). Це проявлялося у зростанні кількості гемолізованих еритроцитів на піку гемолізу та скороченням тривалості процесу до 7 хв (рис. 3.6*А*).

За введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього щурам з ЦД ми спостерігали зміщення піку еритрограми вправо та зростання часу гемолізу (рис. 3.6*А*). Також встановлено, що екстракти червоних і жовтих плодів сприяли збільшенню популяції еритроцитів із підвищеною стійкістю (рис. 3.6*Б*).

Натомість, за введення екстракту ЛК пік еритрограми змістився вліво, а розподіл еритроцитів за віковими популяціями продемонстрував збільшення клітин зі зниженою резистентністю приблизно в 1,5 рази (рис. 3.6).

Для оцінки стану різних ланок імунної системи експериментальних тварин ми визначали загальну кількість лейкоцитів та аналізували лейкоцитарну формулу периферичної крові. Згідно отриманих результатів, ми не виявили достовірних змін загальної кількості лейкоцитів у щурів з ЦД та за введення досліджуваних екстрактів (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Лейкоцитарна формула периферичної крові щурів у нормі, за ЦД та введення тваринам екстрактів плодів дерену справжнього

Клінічні показники	**Групи**				
	Контроль	ЦД	ЦД + ЧД	ЦД + ЖД	ЦД + ЛК
Кількість лейкоцитів, 10^3 мкл$^{-1}$	11,2 ± 0,5	13,0 ± 1,1	12,0 ± 1,5	11,3 ± 2,7	12,0 ± 0,8
Паличкоядерні нейтрофіли, %	1,16 ± 0,21	1,34 ± 0,42	1,40 ± 0,39	1,40 ± 0,45	1,5 ±0,3
Сегментоядерні нейтрофіли, %	21,5 ± 1,6	16,2 ± 1,8*	19,7 ± 3,8	23,4 ± 3,6	19,2 ± 1,8
Лімфоцити, %	75,4 ± 1,7	80,4 ± 1,4*	75,2 ± 3,7	73,8 ± 3,1	77,5 ± 2,6
Моноцити, %	0,40 ± 0,23	0,41 ± 0,25	1,04 ± 0,30	1,06 ± 0,25	0,52 ± 0,10
Базофіли, %	–	–	–	–	–
Еозинофіли, %	1,15 ± 0,35	0,96 ± 0,29	1,08 ± 0,05	0,50 ± 0,40	1,30 ± 0,32

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$

Розвиток експериментального ЦД у тварин супроводжувався зниженням кількості сегментоядерних нейтрофілів і зростанням відсоткового вмісту лімфоцитів, але загальна кількість паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів не відрізнялася від такої у контрольній групі (табл. 3.5).

Введення екстрактів дерену справжнього призвело до нормалізації кількості сегментоядерних нейтрофілів і лімфоцитів у периферичній крові щурів з ЦД (табл. 3.5). Такі зміни відображають позитивний вплив екстрактів *Cornus mas* L. на гематологічні показники та функціонування клітин імунного захисту за ЦД.

Підсумки до розділу

Виявлено, що екстракти плодів дерену справжнього сприяли приросту маси тіла у щурів з експериментальним ЦД. Встановлено підвищення середнього вмісту гемоглобіну в одному еритроциті за введення екстракту жовтих плодів дерену та логанової кислоти, а також зростання концентрації гемоглобіну у щурів, які отримували екстракт “Логанова кислота”.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [50; 55] та матеріалах конференцій [49; 54; 242].

3.4. Антиоксидантний потенціал екстрактів плодів дерену справжнього

Зниження рівня глюкози в крові є ключовим, проте не єдиним підходом у терапії ЦД. Важливим є застосування препаратів, що проявляють антиоксидантні властивості та здатні бути скавенджерами вільних радикалів. Послаблення оксидативного стресу на ранніх стадіях захворювань може попередити розвиток серйозних ускладнень чи покращити стан хворих на подальших стадіях прогресування хвороби.

3.4.1. Харакеристика антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L., досліджених на моделі ліпідних мембран

Дослідження антиоксидантної активності екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. *in vitro* базувалося на його здатності захищати модельні ліпідні мембрани з фосфатидилхоліну курячого яйця від окиснення вільними радикалами. В наших експериментах ми використовували два фактори, що спричиняли окиснення ліпідної мембрани: УФ-випромінювання типу В та сполуку ААРН. ААРН – це водорозчинна азосполука, яка широко використовується для генерації вільних радикалів. Термічне розкладання ААРН призводить до вивільнення молекулярного азоту та 2 радикалів, які можуть взаємодіяти, формуючи стабільні продукти або реагувати з молекулярним киснем з утворенням пероксильних радикалів [19]. Активні форми оксигену, індуковані ААРН, здатні окиснювати флюоресцентний зонд DPH-PA (з англ. diphenylhexatriene-propionic acid), тим самим гасячи його флюоресценцію. Значення відносної інтенсивності флюоресценції цього зонда приймали як показник ступеня окиснення моделі ліпідної мембрани. Його розраховували за відношенням інтенсивності флюоресценції DPH-PA після 30 хв окиснення за присутності досліджуваних екстрактів або контрольної проби до початкового значення інтенсивності.

Кінетичні криві відносної інтенсивності флюоресценції зонда DPH-PA у мембрані ліпосом за додавання екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. представлені на рис. 3.7.

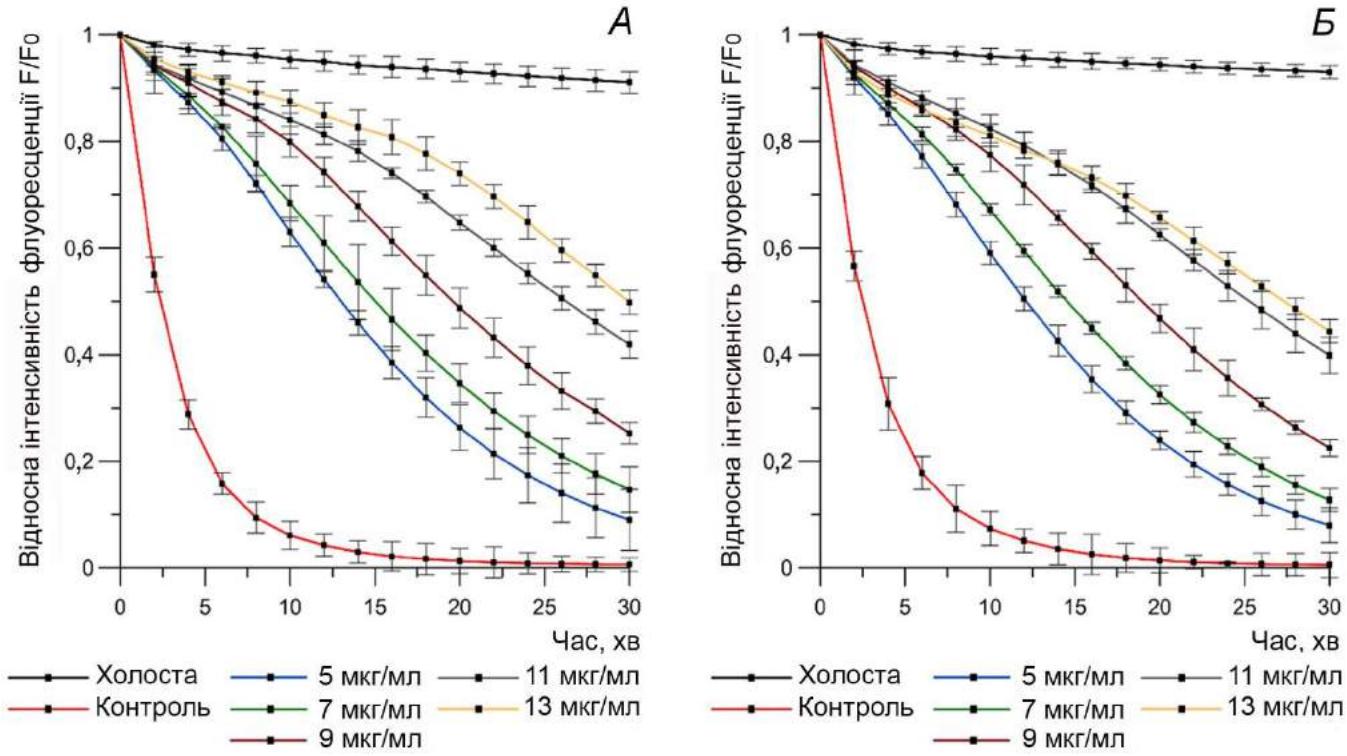


Рис. 3.7. Відносна інтенсивність флюоресценції зонда DPH-PA як функція від часу окиснення ліпосом, утворених з фосфатидилхоліну курячого яйця, за додавання розчину ААРН та екстрактів червоних плодів (*А*) і жовтих плодів (*Б*) дерену справжнього у різних концентраціях. Відносна зміна інтенсивності флюоресценції F / F0 є мірою ступеня перекисного окиснення ліпідів (F0 – інтенсивність флюоресценції в контрольній пробі; F – інтенсивність флюоресценції зразків за додавання екстрактів)

Згідно одержаних результатів інтенсивність флюоресценції зонда зростає пропорційно зі збільшенням концентрації екстрактів (від 5 до 13 мкг/мл), доданих у реакційне середовище (рис. 3.7), що свідчить про зменшення кількості вільних радикалів у розчині. Отже, біоактивні речовини, що містяться в екстрактах, проявляють властивості скавенджерів (антирадикальні/антиоксидантні властивості).

Графік співвідношення між ступенем інгібування окиснення ліпосом за впливу екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. був основою для визначення параметра IC_{50} (лінійні рівняння R2 = 0,9867 та R2 = 0,9903, відповідно). Параметр IC_{50} характеризує таку концентрацію екстракту, що спричиняє зменшення окиснення ліпосом на 50% за впливу вільних радикалів порівняно до контрольної

проби. Значення цього параметра представлені в табл. 3.6 та проведено їхнє порівняння з L-аскорбіновою кислотою. Антиоксидантні параметри IC_{50} для L-аскорбінової кислоти становили: за впливу ААРН – 22,80 ± 2,19 мкг/мл, УФ-В – 115,3 ± 2,5 мкг/мл [200].

Ми встановили, що обидва екстракти проявляють здатність захищати ліпідну мембрану від вільних радикалів, індукованих ААРН. Екстракти червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. продемонстрували у 1,8 та 1,9 рази, відповідно, вищу антиоксидантну активність, ніж L-аскорбінова кислота.

Таблиця 3.6

Антиоксидантні параметри (IC_{50}) *in vitro* екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього за впливу ААРН та УФ-випромінювання типу В (УФ-В)

Індуктор вільних радикалів	Червоний дерен (мкг/мл)	Жовтий дерен (мкг/мл)
ААРН	12,60 ± 0,87	12,39 ± 0,96
УФ-В	26,48 ± 3,90	26,24 ± 2,11

Також ми дослідили окиснення модельних ліпідних мембран, що піддаються дії УФ-випромінювання без та за додавання досліджуваних екстрактів. Інтенсивність окиснення ліпідів характеризували за концентрацією МДА, що утворюється в результаті ПОЛ.

На основі одержаних результатів розраховували відсоток інгібування окиснення ліпідів за обраний час експозиції (2 год) та визначали концентрацію екстрактів, яка зменшує окиснення на 50% (IC_{50}) (табл. 3.6). Аналізуючи дані експерименту, ми встановили, що екстракти червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. зменшували окиснення фосфатидилхоліну ліпідної мембрани, що проявлялось у зниженні вмісту МДА. Антиоксидантна активність обох екстрактів може бути зумовлена їх молекулярним складом.

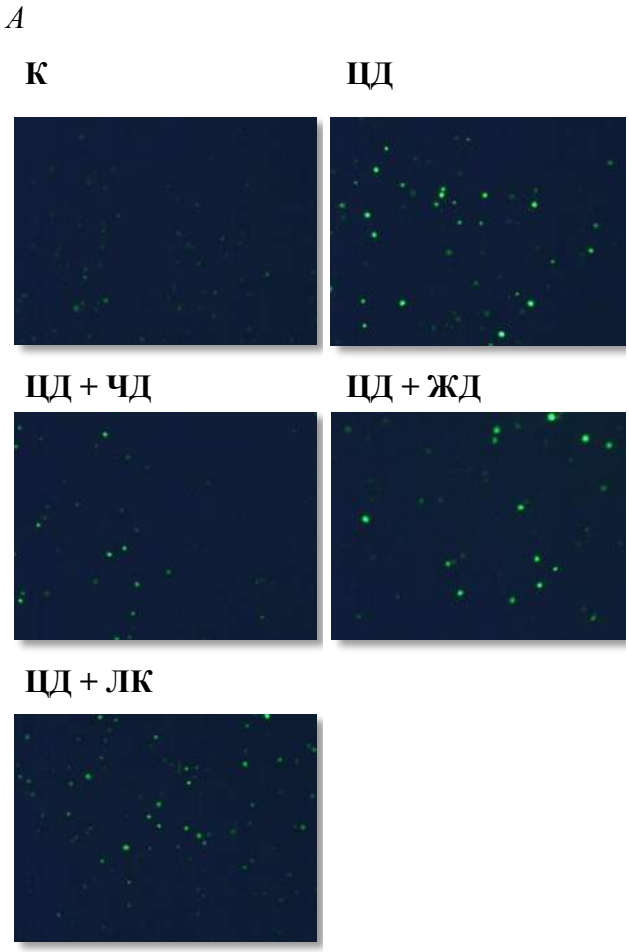
3.4.2. Зміна рівня маркерних показників, що характеризують ступінь розвитку оксидативного стресу, в плазмі та лейкоцитах крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД за впливу екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти

Розуміння механізмів, за яких відбувається надмірна генерація АФО, та можливих способів знешкодження реактивних сполук є важливим для розробки терапевтичних засобів, що забезпечать зменшення негативних наслідків, пов'язаних з оксидативним стресом. Відомо, що оксидативний стрес та процеси, що його супроводжують, є одним із чинників, що зумовлюють порушення сигнальних шляхів, спричиняють модифікацію протеїнів, посилюють ПОЛ та інші пошкодження. Лейкоцити крові зазнають впливу вільних радикалів, що утворюються за ЦД та, водночас, самі є одним із джерел АФО в організмі.

Для оцінки рівня АФО в лейкоцитах крові щурів застосовували метод флюоресцентної мікроскопії із використанням барвника 2',7'-дихлородигідро-флюоресцеїн діацетату (англ. H_2DCFDA – 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate). H_2DCFDA здатний спонтанно проникати через мембрану всередину клітини, де за участі неспецифічних естераз він спершу розщеплюється з утворенням нефлюоресцентної сполуки – дихлородигідрофлюоресцеїну, який після окиснення за участі внутрішньоклітинних АФО перетворювався у флюоресціюючий 2′,7′-дихлорфлюоресцеїн (англ. DCF – dichlorofluorescein) [83].

Згідно одержаних результатів, розвиток експериментального діабету супроводжувався достовірним збільшенням середніх значень флюоресценції лейкоцитів крові, що свідчило про зростання продукції АФО на 62 % порівняно з контрольними показниками (рис. 3.8). Процес надмірного утворення АФО може ініціюватися через протеїнкіназа С-опосередковану активацію НАДФН-оксидази у відповідь на хронічну гіперглікемію. Також, лейкоцити мають й інші ферментативні системи генерації реактивних сполук: пероксидази – мієлопероксидазу у нейтрофілах, еозинофільну пероксидазу в еозинофілах, пероксидазу в цитоплазматичних гранулах моноцитів, ферменти дихального ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій і ендоплазматичної системи цитохрому Р-450, а також

NO-синтазу [65; 137]. Зміна функціонування ферментних систем за діабету і є можливою причиною надпродукції АФО.



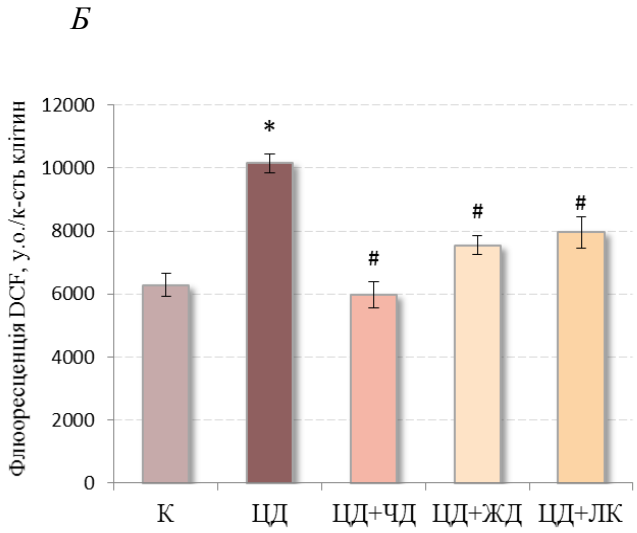


Рис. 3.8. Флюоресцентні мікрофотографії (*А*) та оцифровані дані рівня АФО в лейкоцитах крові (*Б*) щурів з ЦД за введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену тваринам з ЦД обумовлювало зниження рівня АФО у лейкоцитах щурів на 41% та 26%, відповідно, а екстракт логанової кислоти призводив до зменшення досліджуваного показника на 17% (рис. 3.8*Б*).

Згідно результатів досліджень найвираженіший антиоксидантний ефект проявляв екстракт червоних плодів дерену справжнього (рис. 3.8), що може бути зумовлено наявністю в його складі антоціанів, яких немає в екстрактах жовтих плодів і “Логанова кислота”.

Продукція АФО, як внутрішньоклітинних, так і позаклітинних, в нормі знаходиться під впорядкованим контролем системи антиоксидантного захисту, тому її нормальне функціонування є важливим для всіх клітин організму. Проте, низка патологічних станів, в тому числі гіперглікемія за ЦД, може спричиняти порушення структури та функцій антиоксидантних ферментів.

Зокрема, згідно результатів наших досліджень у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом виявлено зниження активності супероксиддисмутази (СОД) на 34% та каталази (КАТ) на 27% порівняно до показників контролю (рис. 3.9).

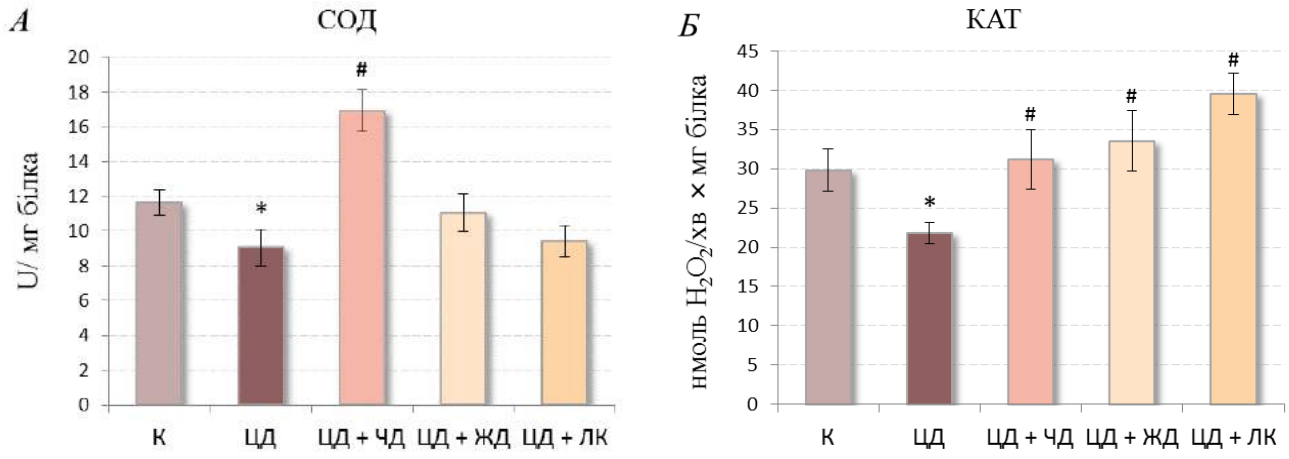


Рис. 3.9. Вплив екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти на активність супероксиддисмутази (*А*) та каталази (*Б*) в лейкоцитах периферичної крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Також, відмічено порушення глутатіонової ланки захисту в лейкоцитах (рис. 3.10), що відображається у зниженні активності глутатіонпероксидази (ГПО) на 27% (рис. 3.10*А*) та глутатіонредуктази (ГР) на 23% (рис. 3.10*Б*).

За оксидативного стресу, що розвивається у разі ЦД, ферменти можуть зазнавати прямого або непрямого окиснення АФО та АФН [22]. Ці процеси призводять до модифікація структури ензимів та, відповідно, зміни функцій та зниження активності.

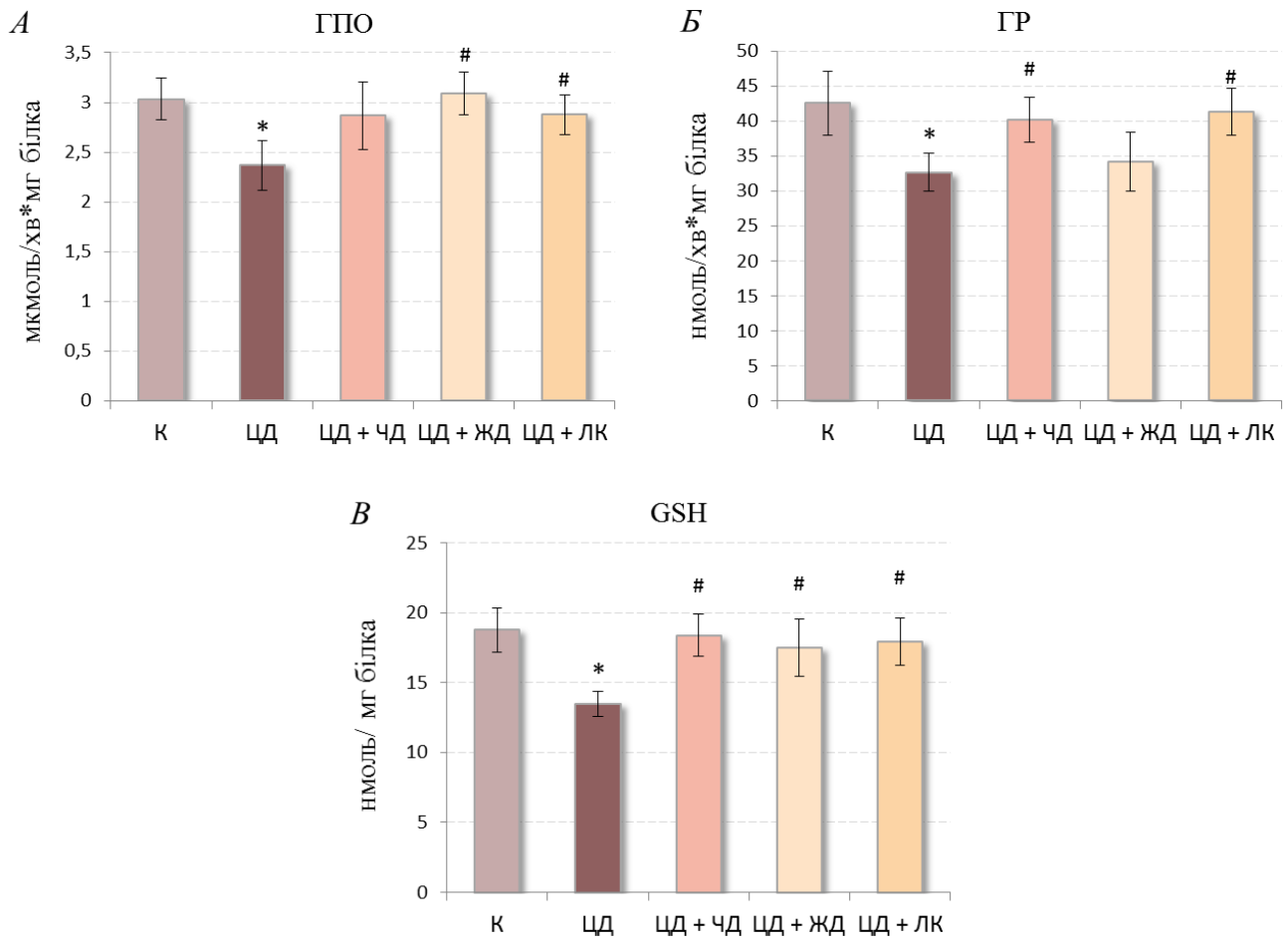


Рис. 3.10. Вплив екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти на стан глутатіонової ланки захисту – активність глутатіонпероксидази (*А*), глутатіонредуктази (*Б*) та вміст відновленого глутатіону (*В*) в лейкоцитах периферичної крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Введення екстракту червоних плодів дерену призвело до зростання активності СОД та КАТ на 87% та 43%, відповідно (рис. 3.9), і незначного, проте достовірного підвищення активності ГР (на 23%, рис. 3.10*Б*). Екстракт жовтих плодів дерену сприяв зростанню активності КАТ на 42% (рис. 3.9*Б*) та ГПО на 24% (рис. 3.10*А*) порівняно з тваринами з діабетом. Введення логанової кислоти тваринам із ЦД спричинило збільшення активності КАТ на 85% (рис. 3.9*Б*), але не було виявлено достовірних змін в активності СОД порівняно з групою діабетичних тварин, яка не отримувала лікування (рис. 3.9*А*). У той же час в лейкоцитах тварин, яким вводили

логанову кислоту, спостерігали зростання активності ГПО та ГР на 24% та 27%, відповідно (рис. 3.10*А* та *Б*).

Отже, біологічно активні речовини в складі екстрактів виявляють антиоксидантні властивості завдяки здатності знешкоджувати вільні радикали, які спричиняють порушення у функціонуванні ензимів.

Багато антиоксидантних механізмів використовують відновлений глутатіон (GSH) як потужний відновник під час процесу детоксикації АФО. Відновлений глутатіон – низькомолекулярний тіол, донор гідрогену в окисно-відновних реакціях і здатний знешкоджувати вільні радикали. Глутатіон також входить до складу глутатіонової ланки захисту як косубстрат ГР, ГПО, глутатіонтрансферази, забезпечуючи комплексний антиоксидантний вплив. Згідно одержаних нами результатів, виявлено зниження концентрації цього природнього антиоксиданту на 31% у лейкоцитах щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД (рис. 3.10*В*).

Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього тваринам із ЦД призвело до зростання вмісту GSH на 43% та 33%, відповідно, в лейкоцитах (рис. 3.10*В*). Логанова кислота спричиняла підвищення концентрації відновленого глутатіону на 32% у лейкоцитах (рис. 3.10*В*).

Надмірне утворення АФО за ЦД спричиняє окиснення різних біологічних макромолекул, таких як білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, зумовлюючи тим самим структурні та функціональні зміни цих сполук. Окиснення ліпідів призводить до формування гідропероксидів, які згодом піддаються фрагментації, утворюючи широкий спектр реакційноздатних проміжних продуктів, зокрема акролеїн, 4-гідроксиноненаль (HNE), 4-оксононеналь (ONE), малоновий діальдегід (МДА) та ін. [100]. Оскільки ліпіди та ліпопротеїни біологічних мембран є головними мішенями АФО, тому для оцінки ступеня перекисного окиснення аналізують вміст МДА на основі його взаємодії з тіобарбітуровою кислотою.

Як зображено на рис. 3.11, рівень ТБК-активних продуктів у плазмі крові збільшився у 1,7 раза у групі щурів з ЦД порівняно з контрольними щурами. Водночас, спостерігалося також зростання даного показника у лейкоцитах тварин з ЦД у 1,3 рази (рис. 3.11*Б*).

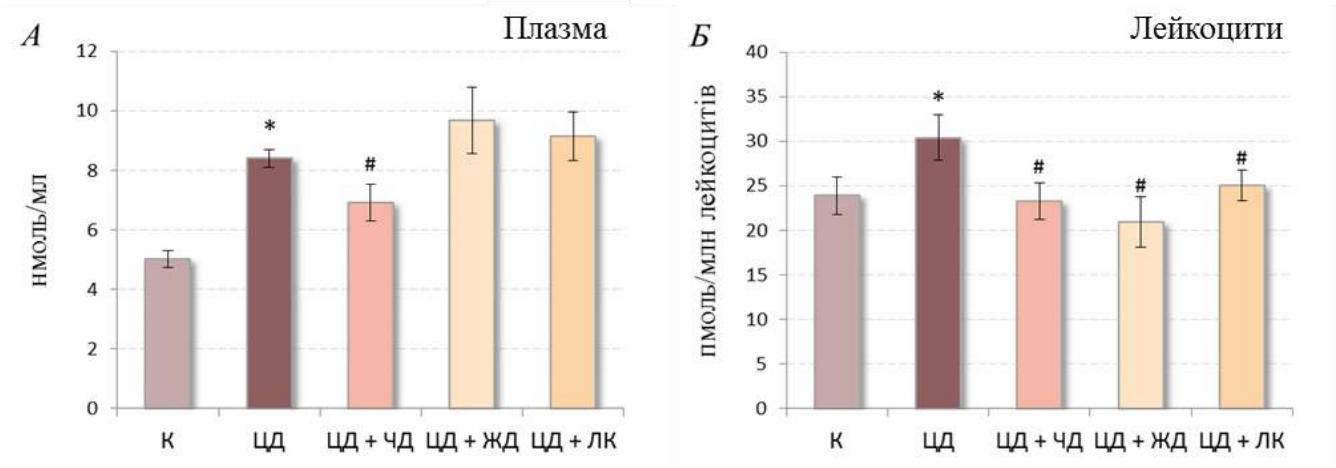


Рис. 3.11. Вміст ТБК-активних продуктів в плазмі крові (*А*) та лейкоцитах (*Б*) щурів в нормі, за ЦД та введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Як екстракти червоних і жовтих плодів дерену справжнього, так і логанова кислота сприяли достовірному зниженню вмісту ТБК-активних продуктів в лейкоцитах крові щурів у 1,3, 1,5 і 1,2 рази, відповідно (рис. 3.11*Б*). Натомість, у плазмі крові тварин з діабетом спостерігалося достовірне зменшення рівня ТБК-активних продуктів (у 1,2 рази) лише за введення екстракту червоних плодів дерену (рис. 3.11*А*). Ми припускаємо, що саме наявність в складі екстракту червоних плодів дерену біологічно активних сполук (зокрема, антоціанів та похідних кемпферолу), які відсутні в інших досліджуваних екстрактах, обумовлює ефективніший захист ліпідів мембран від перекисного окиснення.

За оксидативного стресу реакційноздатні форми оксигену реагують зі залишками аліфатичних амінокислот із подальшим формуванням кето- і альдегідопохідних білків. Внаслідок окисної модифікації білків (ОМБ) відбувається зміна їх характеристик, таких як гідрофобність, ізоелектрична точка, термостабільність, підвищується чутливість білків до протеолізу та спостерігається зниження ензиматичної активності. Ми дослідили зростання рівня ОМБ нейтрального (детектували за довжини хвилі 370 нм) і основного характеру (детектували за довжини хвилі 430 нм) у 1,5 та 1,3 раза, відповідно, в плазмі

(рис. 3.12*А*) та у лейкоцитах (у 2,5 та 1,5 раза, відповідно, рис. 3.12*Б*) крові щурів за діабету.

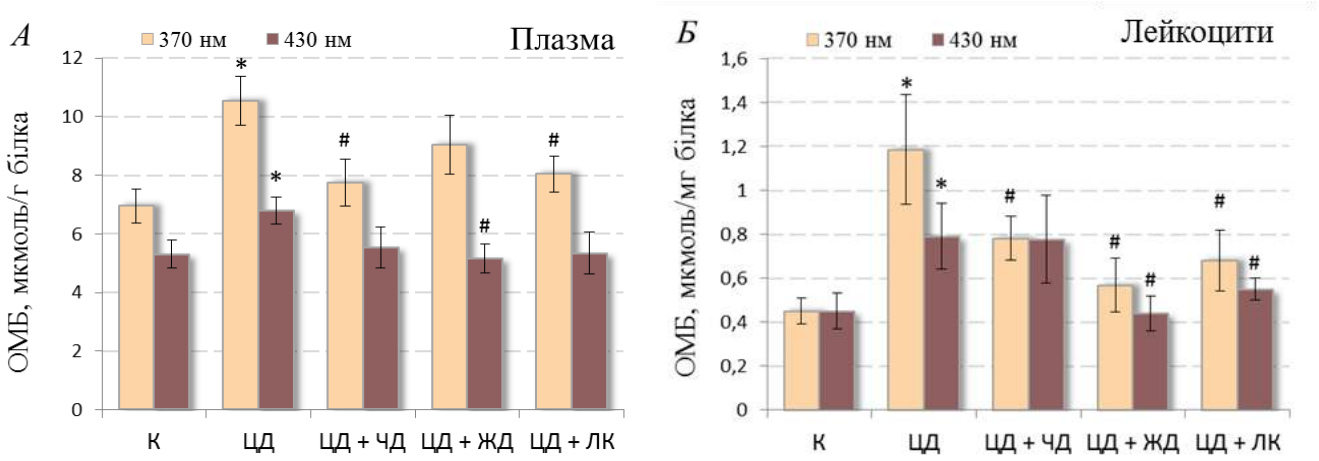


Рис. 3.12. Рівень окисно модифікованих білків нейтрального ($ОМБ_{370}$) й основного ($ОМБ_{430}$) характеру в плазмі (*А*) та лейкоцитах (*Б*) крові щурів у нормі, за ЦД та введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього і логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Наші дослідження продемонстрували зміни вмісту у плазмі крові щурів ОМБ нейтрального характеру за введення екстракту червоних плодів дерену (у 1,4 раза) та логанової кислоти (на 27%, рис. 3.12*А*). Натомість рівень ОМБ основного характеру помітно знижувався в тварин з ЦД на фоні введення екстракту жовтих плодів дерену (у 1,2 раза, рис. 3.12*А*).

В лейкоцитах крові ми виявили достовірне зниження $ОМБ_{370}$ на 34% за введення екстракту червоних плодів дерену тваринам з ЦД (рис. 3.12*Б*). Екстракт жовтих плодів дерену та логанова кислота спричиняли зміни ОМБ нейтрального характеру на 52% та 43%, відповідно (рис. 3.12*Б*). Водночас, показники ОМБ основного характеру у лейкоцитах знижувались в 1,8 та 1,5 рази за введення екстракту жовтих плодів дерену та логанової кислоти, відповідно (рис. 3.12*Б*).

Іншим біомаркером окисного ушкодження білків, що виникає за оксидативного та карбонільного стресу і посилює запальні процеси в організмі є кінцеві продукти оксидації протеїнів (AOPPs). Ці сполуки утворюються у реакції

між білками плазми (найчастіше альбуміни) та хлорованими окисниками, такими як хлораміни та гіпохлоритна кислота. В процесі утворення AOPPs важливу роль відіграє фермент МПО, що локалізується в азурофільних гранулах лейкоцитів і є елементом антимікробної ланки захисту цих клітин. Після активації фагоцитів відбувається дегрануляція і МПО вивільняється або всередину фагосоми, або в позаклітинний простір. Тому, важливим було дослідити активність МПО та рівень AOPPs у лейкоцитах і плазмі крові експериментальних тварин за введення екстрактів плодів дерену справжнього.

Ми встановили підвищення рівня AOPPs у плазмі крові щурів за ЦД на 65% порівняно з контрольною групою (рис. 3.13*Б*). Водночас, у тварин з діабетом виявили зростання активності МПО в плазмі крові на 92% (рис. 3.13*А*). Такі результати можуть свідчити про значне вивільнення МПО з лейкоцитів, зумовлене їх активацією внаслідок функціональних і метаболічних змін за розвитку ЦД.

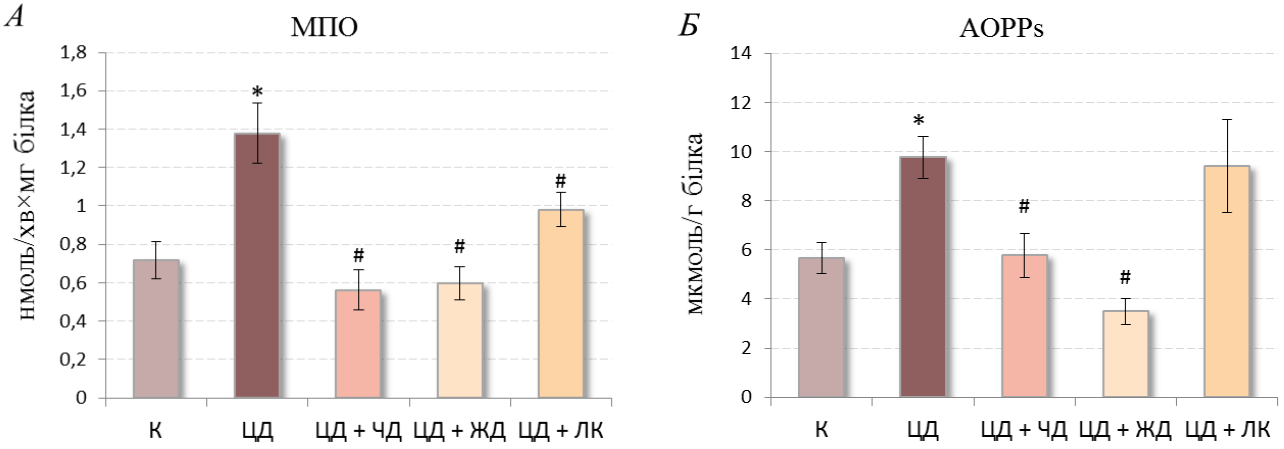


Рис. 3.13. Вплив екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього і логанової кислоти (ЛК) на активність мієлопероксидази (*А*) та вміст AOPPs (*Б*) в плазмі крові щурів із стрептозотоцин-індукованим ЦД

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Введення екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. щурам з ЦД спричиняло зниження активності ензиму (на 60% та 57%, відповідно, рис. 3.13*А*) і, як наслідок, зменшення вмісту AOPPs (в 1,6 та 3,2 рази, відповідно) в

плазмі (рис. 3.13*Б*). Натомість логанова кислота спричиняла достовірне зниження лише активності МПО (на 29%, рис. 3.13*А*).

Досліджуючи активність МПО та рівень AOPPs в лейкоцитах периферичної крові щурів з ЦД виявили зменшення цих показників на 51% та 41%, відповідно (рис. 3.14). Причинами зниження активності МПО в лейкоцитах крові, ймовірно, є ті ж метаболічні порушення та розвиток оксидативного стресу за ЦД, що спричиняє зміни активності ензимів антиоксидантної системи захисту, як описано вище.

Підвищення активності МПО (рис. 3.14*А*) в лейкоцитах крові тварин з ЦД спостерігали за введення екстрактів червоних (у 2,6 раза) і жовтих плодів (у 2,2 раза). Зростання активності МПО в лейкоцитах може бути пов'язано зі зменшенням інтенсивності її вивільнення у позаклітинний простір. Вміст AOPPs зростав до рівня контрольних значень в усіх груп тварин, яким вводили досліджувані екстракти (рис. 3.14*Б*).

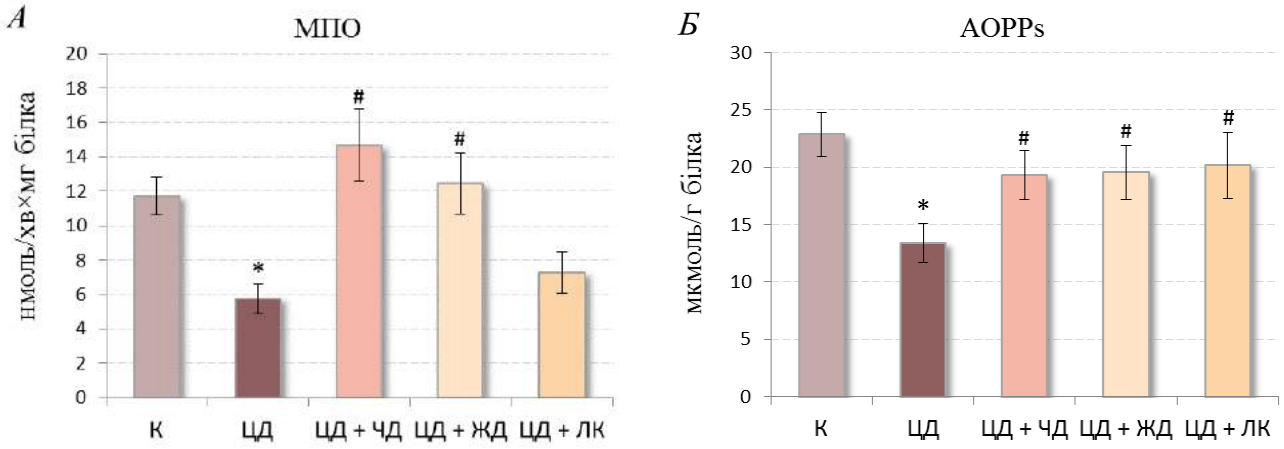


Рис. 3.14. Вплив екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього і логанової кислоти (ЛК) на активність мієлопероксидази (*А*) та вміст AOPPs (*Б*) у лейкоцитах крові щурів із стрептозотоцин-індукованим ЦД

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Підсумки до розділу

Дослідження антиоксидантних властивостей екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. *in vitro* на моделі мембран ліпосом продемонструвало здатність обох екстрактів захищати ліпідну мембрану, утворену з фосфатидилхоліну, від вільних радикалів, індукованих хімічними та фізичними чинниками. Екстракти ефективніше захищають модельні ліпідні мембрани від вільних радикалів, утворених за термічного розкладання сполуки ААРН, ніж від окиснення, індукованого за впливу УФ-випромінювання типу В.

Введення екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти попереджає розвиток оксидативного стресу у крові щурів з ЦД, що проявлялось у зниженні вмісту АФО, зменшенні інтенсивності процесів окисної модифікації білків і перекисного окиснення ліпідів, а також сприяє підвищенню активності окремих ферментів антиоксидантного захисту.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [50; 55; 189] та матеріалах конференцій [6; 51; 52; 53; 59; 236].

3.5. Вплив екстрактів плодів дерену справжнього на рівень кінцевих продуктів глікації та рецепторів до них – експонованих на мембрані лейкоцитів (RAGE) і розчинних у плазмі (sRAGE) крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД

Цукровий діабет є фактором ризику розвитку численних супутніх захворювань, таких як ішемічна хвороба артерій, інсульт, ретинопатія, нефропатія, тощо. Основною причиною, що призводить до патофізіологічних змін за діабету, є хронічний вплив гіперглікемії крові. Гіперглікемія спричиняє посилення неферментативного глікозилювання білків і ліпідів та, як наслідок, утворення реакційноздатних сполук і накопичення кінцевих продуктів глікації [16]. Як відомо, AGEs здатні утворювати внутрішньо- та позаклітинні зшивки з різними макромолекулами, що спричиняє зміну структури та функцій останніх і, в подальшому, розвитку ускладнень діабету.

Окрім того, AGEs є важливим діагностичним маркером, що дає змогу аналізувати вплив лікування на перебіг хвороби. Запобігання утворенню або зменшенню рівня AGEs має терапевтичний потенціал для уповільнення прогресування діабетичних ускладнень.

Згідно з нашими результатами, за ЦД спостерігалося зростання рівня AGEs в плазмі крові щурів у 1,5 рази порівняно з показниками контролю (рис. 3.15*А*). Ці результати узгоджуються з даними рівня глюкози в крові та глікозильованого гемоглобіну у щурів з ЦД.

Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену тваринам з ЦД призвело до зниження рівня AGEs на 23% та 21% у плазмі крові, відповідно. Екстракт “Логанова кислота” не спричиняв достовірних змін досліджуваного показника (рис. 3.15*А*).

Оскільки функціональний стан імунокомпетентних клітин крові за ЦД є основною ціллю наших досліджень і, водночас, саме ці клітини одними з перших зазнають впливу високого рівня глюкози, тому необхідно було проаналізувати вміст AGEs в лейкоцитах периферичної крові. Ми отримали цікаві результати, що свідчать про зниження даного показника у 1,6 рази за ЦД порівняно з вмістом AGEs

у лейкоцитах тварин контрольної групи (рис. 3.15*Б*). Такі результати можна пояснити тим, що глікозилювання є спонтанною реакцією і залежить від періоду напіввиведення білка, ступеня та тривалості гіперглікемії і проникності клітин чи тканини для вільної глюкози [108]. Ми можемо припустити, що такі зміни рівня AGEs можуть бути пов'язані з порушенням транспорту глюкози всередину лейкоцитів за діабету (п. 3.6).

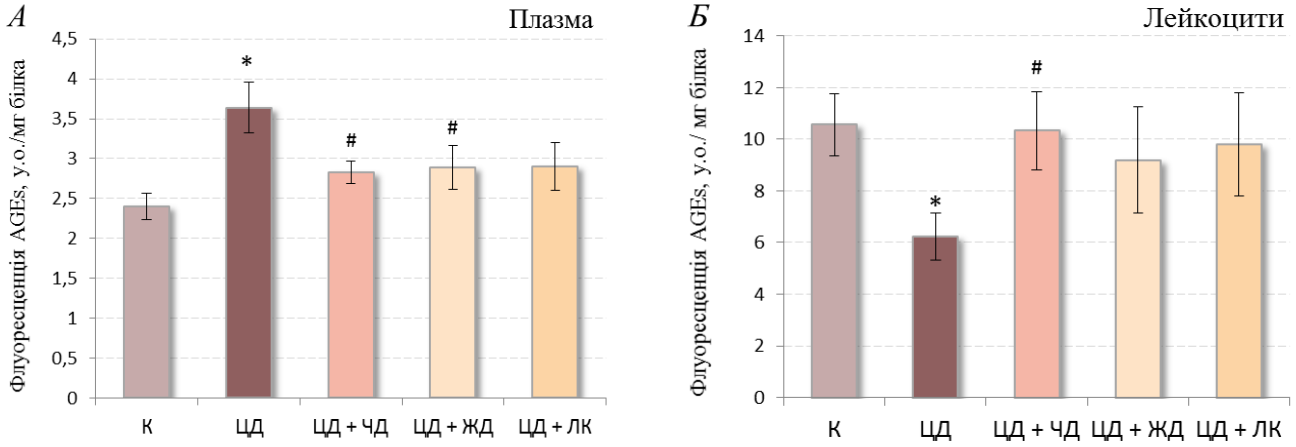


Рис. 3.15. Вплив екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК) на рівень AGEs в плазмі (*А*) та лейкоцитах (*Б*) крові щурів з експериментальним цукровим діабетом

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Введення екстракту червоних плодів тваринам зі стрептозотоцин-індукованим діабетом сприяло зростанню вмісту AGEs у лейкоцитах на 65%, що може бути пов'язано з покращенням поглинання глюкози клітинами та подальшим підвищенням рівня AGEs до значень у контрольній групі тварин (рис. 3.15*Б*). Ендогенне утворення AGEs є частиною нормального метаболічного процесу. Як правило, AGEs формуються фізіологічно у всіх тканинах і рідинах організму, як внутрішньоклітинно, так і позаклітинно, коли карбонільні групи редукуючих вуглеводів неферментативно реагують з вільними аміногрупами білків. Проте фактори, що визначають формування AGEs за фізіологічних умов, нез'ясовані [31; 130].

Механізм дії AGEs на організм визначається їх взаємодією з поверхневими клітинними рецепторами – RAGEs, внаслідок якої у клітинах активуються прозапальні сигнальні шляхи. За фізіологічних умов RAGE експресується на низьких рівнях у багатьох типах клітин, зокрема кардіоміоцитах, нейронах, ендотеліальних клітинах судин, дендритних клітинах, нейтрофілах, моноцитах/макрофагах, лімфоцитах тощо. Встановлено, AGE–RAGE взаємодія відіграє важливу роль в патогенезі ЦД 1 та 2 типів і супутніх ускладнень.

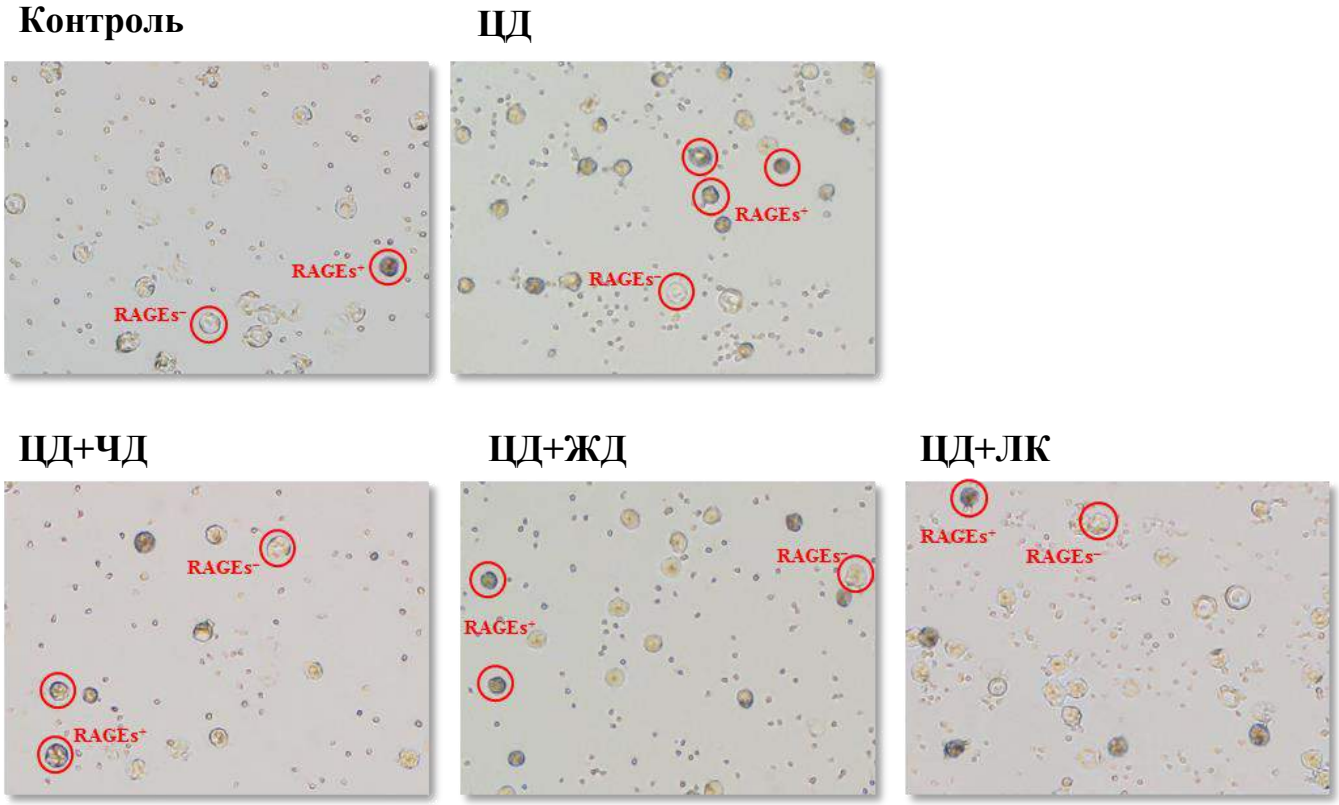
Для визначення вмісту мембранозв'язаних RAGEs у лейкоцитах периферичної крові проводили імуноцитохімічний аналіз. В процесі аналізу результатів клітини розділяли на RAGE-позитивні – $RAGEs^{+}$ та RAGE-негативні – $RAGEs^{-}$ (рис. 3.16*А*).

На основі одержаних даних, ми виявили незначне, проте достовірне зростання (на 10 %) кількості рецепторів до AGEs на мембрані лейкоцитів (рис. 3.16*Б*). Відомо, що експресія гена RAGE та трансляція цього рецептора посилюється за наявності його лігандів, створюючи петлю позитивного зворотного зв'язку, яка зумовлює активацію лейкоцитів [75]. Підвищення вмісту AGEs у плазмі крові за ЦД порівняно з контролем (рис. 3.15*А*), імовірно, зумовлювало посилене експонування RAGEs на мембранах імунокомпетентних клітин (рис. 3.16).

Як згадувалось раніше, RAGE має кілька ізоформ, однією з яких є його позаклітинна розчинна форма sRAGE, в структурі якої відсутній С-кінцевий домен, але наявні усі імуноглобулінові домени fl-RAGE. На даний час є багато суперечливих наукових даних щодо зниження/зростання рівня sRAGE за ЦД [94; 193].

Згідно одержаних нами результатів, спостерігається зростання рівня sRAGE в плазмі крові щурів з діабетом (рис. 3.17), натомість за введення екстракту червоних плодів дерену досліджуваний показник знижувався до значень контрольних тварин.

А



Б

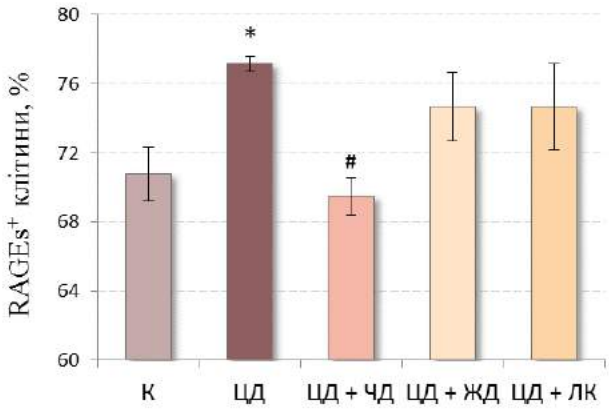
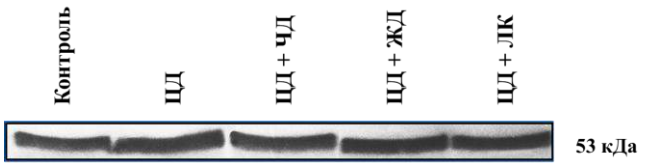


Рис. 3.16. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів крові за використання антитіл до RAGEs (*А*) та оцифровані результати кількості RAGEs на мембрані лейкоцитів (*Б*) за введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК) щурам із експериментальним ЦД

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Відомо, що розчинна форма рецептора RAGE може утворюватися двома шляхами: внаслідок розщеплення flRAGE металопротеїназами або альтернативним сплайсингом. Ми можемо припустити, що зростання sRAGE у плазмі може бути зумовлене посиленим розщепленням flRAGE, кількість якого теж зростає за ЦД (рис. 3.16). Зниження кількості RAGE у тварин з ЦД за введення екстракту червоних

плодів дерену справжнього (рис. 3.17) може бути пов’язане зі здатністю цього екстракту впливати на рівень AGEs (рис. 3.15), як було описано у наших результатах досліджень.



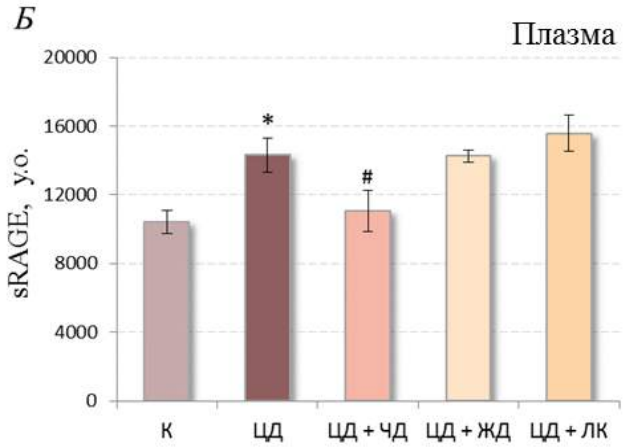


Рис. 3.17. Дослідження методом імуноблот-аналізу кількості sRAGEs в плазмі крові щурів з експериментальним ЦД за введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Підсумки до розділу

Встановлено зростання рівня AGEs у плазмі крові щурів з експериментальним ЦД. Водночас, цікавим є той факт, що в лейкоцитах крові тварин з діабетом спостерігали зниження даного показника порівняно з результатами тварин контрольної групи. Імовірно, такі зміни рівня AGEs можуть бути пов’язані з порушенням транспорту глюкози всередину лейкоцитів за діабету. Виявлено, що лише екстракт червоних плодів дерену справжнього зумовлював зниження у плазмі вмісту кінцевих продуктів глікації, а також рецепторів (RAGE), через які реалізується їх функція.

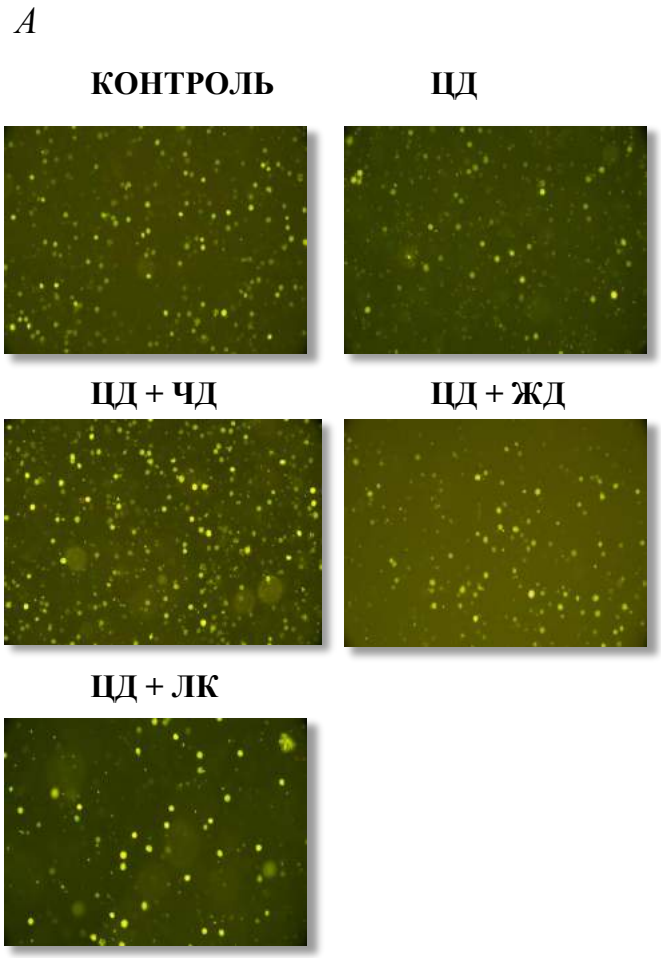
Представлені вище результати опубліковано у статтях [50; 55] та матеріалах конференцій [53; 58; 236].

3.6. Особливості поглинання флюоресцентного аналога глюкози лейкоцитами та вміст АТФ у цих клітинах крові за введення екстрактів *Cornus mas* L. тваринам з ЦД

Клінічні та лабораторні спостереження, а також наші дослідження, свідчать про порушення функціонування лейкоцитів за ЦД [5; 12; 78; 210]. Наявні літературні дані розкривають зміни властивостей лейкоцитів, їх хемотаксису, адгезії та фагоцитозу, які є ключовими елементами імунної відповіді. Аналізуючи причини функціональних порушень у лейкоцитах, а також зниження активності ензимів антиоксидантного захисту та внутрішньоклітинного рівня AGEs за діабету, ми припустили, що однією із них можуть бути зміни метаболічного профілю цих клітин. Найважливішим джерелом енергії для лейкоцитів, як клітин з інтенсивним метаболізмом, є глюкоза. Саме тому, патологічні зміни транспорту та внутрішньоклітинного метаболізму глюкози можуть сприяти зміненому статусу лейкоцитів за ЦД [170].

Ми дослідили здатність лейкоцитів поглинати флюоресцентний аналог глюкози в нормі, за діабету і введення досліджуваних екстрактів. Аналіз поглинання флюоресцентно-міченої глюкози – 2-NBDG клітинами проводили двома методами: за допомогою флюоресцентної мікроскопії та методом проточної цитометрії.

Згідно з результатами даних аналізу флюоресцентних фотографій лейкоцитів виявлено достовірне, хоча незначне зниження (на 10%) поглинання 2-NBDG цими клітинами за діабету порівняно з контрольними показниками (рис. 3.18). Поглинання глюкози клітинами опосередковується глюкозними транспортерами. У лейкоцитах наявні GLUT1, 3 та 4 ізоформи, які є високоафінними транспортерами. Через низьку константу Міхаеліса (Км) ці транспортери функціонують зі швидкістю, близькою до максимальної. Таким чином, рівень експресії їх генів і кількість інтегрованих GLUT у плазматичній мембрані клітин суттєво впливає на швидкість поглинання глюкози, що може бути визначальним фактором за ЦД [115].



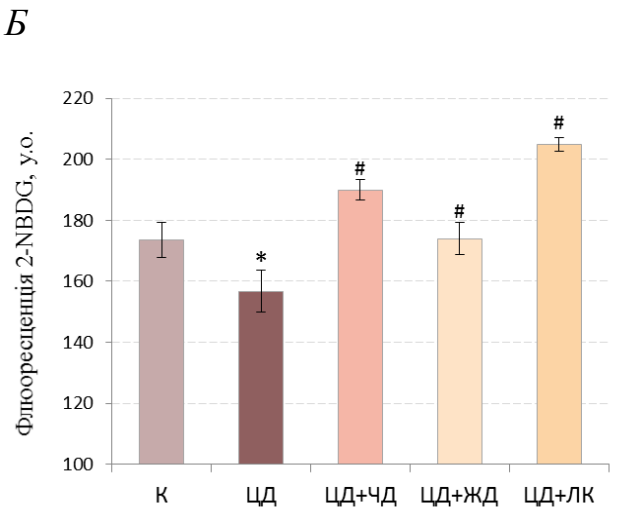


Рис. 3.18. Флюоресцентні мікрофотографії (*А*) та оцифровані результати інтенсивності поглинання 2-NBDG (*Б*) лейкоцитами периферичної крові щурів в нормі, за ЦД та введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього щурам з ЦД сприяло достовірному зростанню інтенсивності поглинання флюоресцентного аналога глюкози лейкоцитами на 21% та 11%, відповідно (рис. 3.18*Б*). Екстракт “Логанова кислота” найефективніше впливав на поглинання 2-NBDG лейкоцитами, що проявлялося в зростанні даного показника на 31% порівняно з тваринами з ЦД, яким не вводили екстракт (рис. 3.18*Б*).

Метод проточної цитометрії дав змогу дослідити поглинання глюкози окремо за популяціями лейкоцитів. Клітини були розділені на популяції умовно базуючись на їх показниках прямого і бічного розсіювання (forward scatter (FS), side scatter (SS)).

Згідно з одержаними результатами ми спостерігали зниження інтенсивності поглинання флюоресцентного аналога глюкози як мононуклеарними, так і поліморфноядерними лейкоцитами крові тварин зі стрептозотоцин-індукованим діабетом порівняно з субпопуляціями лейкоцитів контрольної групи тварин (рис. 3.19*А*). Водночас, ми спостерігали також незначне, проте достовірне, зниження рівня АТФ у лейкоцитах крові щурів з діабетом порівняно до показників контролю (рис. 3.19*Б*).

Відомо, що гіперглікемія, яка розвивається за діабету, може спричиняти порушення функціональної активності нейтрофілів внаслідок зміни певних метаболічних шляхів, зокрема, поліолового шляху, утворення вільних радикалів і кінцевих продуктів глікації, NO-цГМФ шляху, а також гліколізу та глутамінолізу.

Аеробний гліколіз, один із основних метаболічних шляхів, за допомогою якого клітини отримують енергію. За ЦД активність ключових ферментів гліколітичного шляху, зокрема гексокінази, знижена, що, у свою чергу, пригнічує утворення внутрішньоклітинного АТФ [139].

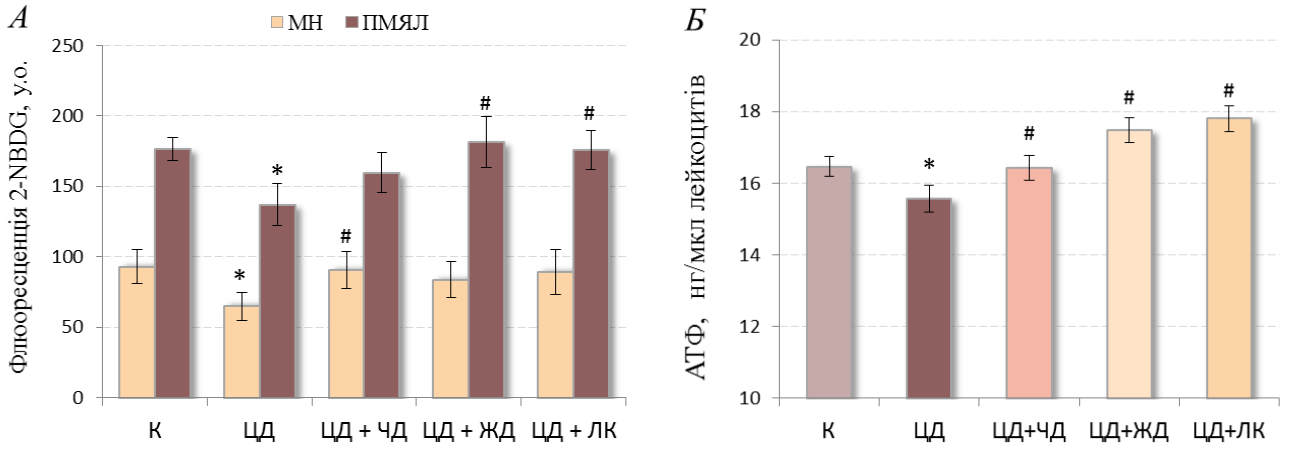


Рис. 3.19. Оцифровані результати проточної цитометрії поглинання флюоресцентно міченого аналога глюкози (2-NBDG) різними субпопуляціями лейкоцитів (*А*: МН – нононуклеарні; ПМЯЛ – поліморфноядерні) та рівень АТФ (*Б*) у лейкоцитах крові щурів у нормі, за ЦД та введення екстрактів червоних (ЧД) і жовтих (ЖД) плодів дерену справжнього та логанової кислоти (ЛК)

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$

За введення екстрактів червоних плодів дерену тваринам з ЦД виявлено підвищення поглинання глюкози лише мононуклеарами крові на 40% (рис. 3.19*А*), тоді як екстракт жовтих плодів дерену і логанова кислота підвищували на 32% та 28%, відповідно, здатність поліморфноядерних лейкоцитів поглинати аналог глюкози (рис. 3.19*А*). Натомість екстракти плодів дерену справжнього та логанова кислота сприяли зростанню рівня АТФ в лейкоцитах, як зображено на рис 3.19*Б*. Це може бути пов'язано зі здатністю біологічно активних компонентів покращувати транспорт глюкози всередину клітини та коригувати метаболічні процеси.

Підсумки до розділу

За стрептозотоцин-індукованого ЦД у щурів лейкоцити периферичної крові характеризуються зниженою здатністю до поглинання глюкози, що, ймовірно, є однією з причин зменшення внутрішньоклітинного рівня АТФ. Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти тваринам зі стрептозотоцин-індукованим ЦД обумовлювало зростання поглинання глюкози та рівня АТФ в лейкоцитах крові.

Представлені вище результати опубліковано у [56].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Цукровий діабет характеризується хронічною гіперглікемією, порушеннями вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів і, як наслідок, розвитком оксидативного стресу. Вільні радикали спричиняють виснаження антиоксидантів організму, запускають активацію запальних процесів, змінюють експресію генів та індукують зміни у структурі макромолекул. Оксидативний стрес може мати значний вплив на транспортери глюкози та рецептори інсуліну [199]. Тому, досліджують гіпоглікемічні препарати та скавенджери вільних радикалів, які здатні не лише знижувати рівень глюкози за діабету, а також зменшити негативний вплив оксидативного стресу та, як наслідок, ризик вторинних ускладнень. З цієї причини терапія, що включає антиоксиданти, знаходить все більшого застосування під час лікування цього захворювання. Це стимулювало виробництво препаратів на основі різних компонентів природного або синтетичного походження [227]. Як відомо, рослини містять безліч сполук, що здатні знешкоджувати вільні радикали. Фітотерапія є популярним напрямком досліджень, оскільки рослинні препарати здатні проявляти широкий спектр дії з мінімум побічних ефектів. Хоча терапія на основі природної рослинної сировини не може повністю замінити інсулін, проте такі лікарські засоби можуть сприяти зниженню дози інсуліну, покращувати стан хворих на ЦД на ранніх етапах захворювання та зменшувати ризик розвитку ускладнень.

Рослини роду Cornus є перспективним об’єктом досліджень для розробки антидіабетичних препаратів. Відомо, що *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. використовується як допоміжний засіб в лікуванні багатьох захворювань, зокрема і діабету [91; 132; 138; 164; 219]. Проте, поширений цей вид на території Кореї, Китаю та Японії. Натомість, в Центральній та Східній Європі росте інший вид – *Cornus mas* L., екстракти плодів якого ми використали в наших експериментальних дослідженнях. Екстракти, очищені від вуглеводів, ліпідів й інших допоміжних речовин, містили лише біологічно активні компоненти. Аналізуючи якісний та кількісний склад екстрактів плодів *Cornus mas* L. ідентифіковано сполуки, які проявляють ряд позитивних ефектів за різних патологічних станів, включаючи ЦД. Зокрема, це іридоїди, антоціани, флавоноли і фенольні кислоти. До складу екстракту

червоних плодів входять всі вище перераховані сполуки, натомість, екстракт жовтих плодів не містить антоціанів, проте в його складі виявлено більше іридоїдів і фенольних кислот. Основним іридоїдним глікозидом жовтих і червоних плодів дерену є логанова кислота. Її вміст найбільший серед усіх іридоїдів, ідентифікованих у складі екстрактів. З жовтих плодів дерену справжнього сортів “Янтарний” та “Флава” було отримано окремий екстракт, який містив ізомери логанової кислоти, що становили 97,6% від загальної кількості біоактивних сполук. Решта 2,4% були представлені ізомерами кафтарової кислоти. Проаналізований екстракт було названо “Логанова кислота” та досліджено нами на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів.

Тваринні моделі експериментального ЦД широко використовуються для дослідження особливостей та маркерів розвитку захворювання і потенційних терапевтичних засобів. Важливим показником ефективності досліджуваних речовин за ЦД є їх здатність проявляти гіпоглікемічну дію. Ми виявили, що екстракти червоних і жовтих плодів сприяли зниженню рівня глюкози й інтегрального показника площі під глікемічними кривими у тесті толерантності до глюкози, натомість логанова кислота не проявляла гіпоглікемічного ефекту. Водночас, достовірне зниження рівня глікозильованого гемоглобіну відбувалося лише у відповідь на введення екстракту червоних плодів дерену. Такі результати можуть бути зумовлені відмінностями в складі екстрактів, що визначає різний механізм їх дії.

Як один з можливих механізмів зниження рівня глюкози в крові є інгібування α-глюкозидази біологічно активними компонентами досліджуваних екстрактів. α-Глюкозидаза – фермент катаболізму складних вуглеводів у травному тракті, що гідролізує α-глікозидні зв’язки полісахаридів із вивільненням вільної глюкози. В подальшому моносахариди всмоктуються в просвіті кишечника і транспортуються в кров [213]. Тому, активність α-глюкозидази є важливим регуляторним фактором на стадії поглинання глюкози в слизовій оболонці кишечника.

У дослідженнях лікарських рослин було виявлено, що біологічно активні речовини, що належать до класу флавонолів, можуть бути потенційними

інгібіторами α-глюкозидази [69; 123; 174; 232]. Відомо, що глікозилювання, наявність подвійного зв'язку в С-кільці та певний розподіл гідроксильних груп на флавоноїдному ядрі відповідають за механізм дії та інгібувальну здатність фенольних сполук на α-глюкозидазу [179]. Панахі та співавт. [161] виявили також ефективне інгібування α-глюкозидази багатими на антоціани екстрактами чорниці та чорної смородини. Встановлена нами високоефективна інгібувальна дія екстрактів плодів дерену справжнього може бути обумовлена синергічним ефектом біоактивних сполук, що містяться в екстрактах.

Згідно даних якісного аналізу складових компонентів, екстракт червоних плодів містить антоціани, зокрема похідні дельфінідину, ціанідину та пеларгонідину, а також похідні кверцетину і кемпферолу. Натомість, у складі екстракту жовтих плодів відсутні антоціани і виявлено лише похідні кверцетину.

Дані літератури свідчать, що кверцетин є одним з найсильніших інгібіторів α-глюкозидази [174]. Нін та ін. повідомляли, що інгібувальна активність флавонолів (кверцетин, кемпферол, кверцетин-3-О-глюкуронід і кемпферол-3-О-рамнозид), ймовірно, зумовлена їх легким зв'язуванням в активному центрі α-глюкозидази [151]. Припускають, що кемпферол може взаємодіяти з деякими амінокислотними залишками, розташованими в активному центрі α-глюкозидази, займаючи каталітичний центр ферменту, що перешкоджає зв'язуванню субстрату і, в кінцевому результаті, пригнічує активність ферменту [168]. Водночас дослідження підтверджують, що глікозиди пеларгонідину, а саме робінобіозид, теж проявляють сильні інгібувальні властивості щодо α-глюкозидази. Доведено, що пеларгонідин 3-робінобіозид може займати місце в зв'язувальній кишені ферменту і формувати множинні водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії [179].

Отже, екстракт червоних плодів містить антоціани та похідні кемпферолу, яких немає в складі інших досліджуваних екстрактів, що може зумовлювати сильніший гіпоглікемічний ефект. Zang та ін. [228] також продемонстрували інший механізм дії кемферолу, пояснюючи зниження рівня глюкози в крові мишей на моделі високожирової дієти шляхом ініціювання сигнального шляху АМФ-активованої протеїнкінази (АМФК – аденозинмонофосфат активована

протеїнкіназа). Активація АМФК спричиняє інгібування шляхів споживання АТФ та стимулює шляхи, що генерують АТФ, і, таким чином, залучена у регуляцію клітинного метаболізму [147]. Активація АМФК призводить до збільшення поглинання глюкози, посилення чутливості тканин до інсуліну та стимулює окиснення жирних кислот у скелетних м'язах та печінці, що робить цей ензим важливою фармакологічною мішенню для лікування діабету [148].

Ми також виявили, що екстракт логанової кислоти проявляв нижчу інгібувальну активність щодо α-глюкозидази порівняно з іншими дослідженими нами екстрактами. Проте, на сьогодні немає достатньо даних, які б розкривали інгібувальний потенціал логанової кислоти на активність цього ензиму. У своїх дослідженнях Kang та ін. [103] припускають, що екстракт іридоїдних глікозидів з *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. може затримувати всмоктування вуглеводів з їжі, чим і пояснюють зниження глюкози в крові тварин з експериментальним ЦД. Логанова кислота теж може мати структурну спорідненість до ферментів, включаючи ті, що регулюють метаболізм глюкози. Водночас, є дані, що геніпозид, природний іридоїдний глікозид, сприяє секреції інсуліну та підвищує рівень білка-транспортера GLUT2 [135]. Натомість, досліджений нами екстракт логанової кислоти не продемонстрував гіпоглікемічного ефекту. Такі результати можуть бути зумовлені коротким періодом введення екстракту, або тим, що нами було обрано низьку дозу логанової кислоти для введення тваринам. Дози та тривалість введення екстрактів плодів *Cornus mas* L. були обрані на основі попередніх досліджень [197; 198; 219]. Доза введення логанової кислоти (20 мг/кг маси тіла тварин) була важливою у наших експериментальних дослідженнях для проведення порівняльного аналізу ефектів екстрактів плодів дерену з їхнім основним складовим компонентом – іридоїдним глікозидом.

З огляду на те, що інгібування активності α-глюкозидази знижує надходження глюкози в кров внаслідок пригнічення її всмоктування, можна припустити, що ефективність екстрактів у зменшенні гіперглікемії після їжі буде залежати від кількості складних вуглеводів у раціоні. Однак, на відміну від акарбози (інгібітора α-глюкозидази), екстракти плодів дерену справжнього можуть всмоктуватися в кров

і діяти не тільки в кишечнику, але виявляти протидіабетичну та антиоксидантну дію на рівні цілого організму [50; 55]. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що процес шлункового травлення не порушує загальний антиоксидантний потенціал екстрактів дерену справжнього [41].

Антиоксидантні властивості препаратів для лікування ЦД мають важливе значення, оскільки оксидативний стрес, що розвивається за гіперглікемії є одним із потужних чинників виникнення супутніх ускладнень. Ініціаторною ланкою розвитку оксидативного стресу є вільні радикали, які проявляють високу реакційну здатність у хімічних перетвореннях і, в зв'язку з цим, здатні порушувати структуру біологічно важливих молекул і клітинного гомеостазу в цілому. Зокрема, інтенсифікування процесів ПОЛ призводить до пошкодження структурних компонентів клітинних мембран. Оскільки у фосфоліпідний бішар плазматичних мембран клітин інтегровані рецептори, сигнальні білки, білкові траспортери, антигени, адгезивні молекули і мембранозв'язані ензими, тому її ушкодження призводить до підвищення проникності для гідрофільних молекул та іонів, порушення трансдукції внутрішньоклітинних сигналів, метаболізму, регуляції експресії генів, змін електрохімічного потенціалу, та, як наслідок, до загибелі клітин [10].

Саме тому, ми дослідили антиоксидантну здатність екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. та логанової кислоти на моделі ліпідних мембран з фосфатидилхоліну курячого яйця *in vitro* та стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів *in vivo*.

Ми встановили, що екстракти плодів дерену справжнього проявляють здатність захищати ліпідну мембрану від вільних радикалів, індукованих хімічними та фізичними чинниками. Водночас, у разі окиснення ліпосом значення IC_{50} для екстрактів червоних і жовтих плодів суттєво не відрізнялись. Це може свідчити про те, що відсутність антоціанів у жовтих плодах принципово не впливає на прояв антиоксидантних властивостей отриманих нами екстрактів плодів дерену справжнього.

Крім того, наші дослідження дали змогу встановити, що екстракти ефективніше захищають ліпідну мембрану від вільних радикалів, індукованих

внаслідок термічного розкладання ААРН, ніж тих, що продукуються ультрафіолетовим випромінюванням типу В. Ліпідний бішар – це полюсна мембрана, побудована з амфіфільних молекул ліпідів. Ультрафіолетове випромінювання може проникати через всю мембрану і спричиняти окиснення ліпідів у внутрішніх шарах ліпосом. Водночас, термічне розкладання сполуки ААРН призводить до формування вільних радикалів у реакційному середовищі, які усувалися біологічно активними компонентами доданих екстрактів.

Як зазначалося раніше, одним з основних компонентів обох екстрактів є флавоноїди. Було встановлено, що вони можуть пригнічувати окиснення ліпідів двома механізмами: (1) шляхом перехоплення внутрішньомембранних радикалів та / або (2) збільшення плинності мембрани. Принцип другого механізму пов'язаний з дезорганізацією ліпідів і, як наслідок, пригніченням поширення радикалів. Навпаки, псевдозрідження мембрани може сприяти ефективній взаємодії молекул антиоксидантів з ліпідними радикалами [64; 87]. Відомо, що завдяки нижчому окисно-відновному потенціалу фенольні сполуки, зокрема флавоноїди (виявлені в складі екстрактів похідні кверцетину і кемпферолу) термодинамічно здатні відновлювати реактивні вільні радикали [122].

Досліджуючи прооксидантну систему у щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД, виявили зростання рівня АФО в лейкоцитах крові, що зумовило розвиток оксидативного стресу і, як наслідок, активацію перекисного окиснення ліпідів й окисну модифікацію білків та інших макромолекул. Ми виявили зростання рівня ТБК-активних продуктів і карбонільних груп у модифікованих білках.

Сукупність процесів, що супроводжують оксидативний стрес, спричиняють виснаження пулу антиоксидантів і порушення функціонування ферментів антиоксидантного захисту.

Відновлений глутатіон є низькомолекулярним антиоксидантом і одним з важливих показників, що характеризує рівень оксидативного стресу всередині клітини. Зниження вмісту GSH за діабету може бути зумовлене кількома факторами. Підвищення рівня глюкози в крові спричиняє зміни в мітохондріальному ланцюзі транспорту електронів та посилює оксидативний стрес, за якого відбувається

надмірне використання GSH. Відновлений глутатіон регенерується з дисульфіду глутатіону за участі глутатіонредуктази в реакції, що потребує НАДФН як кофактора. Відновлений НАДФ$^+$ утворюється у реакції перетворення глюкозо-6-фосфату в 6-фосфоглюконолактон у пентозофосфатному шляху. Також відомо, що за діабету відбувається інтенсифікація поліолового шляху перетворення глюкози в сорбітол, опосередкована альдозоредуктазою, яка використовує НАДФН як кофактор і може конкурувати за НАДФН з глутатіонредуктазою, пригнічуючи тим самим відновлення глутатіону [40].

Ще одним чинником зниження пулу GSH за ЦД може бути зміна функціонування глутатіонредуктази. Порушення активності цього ферменту, як зокрема й інших ферментів антиоксидантної системи захисту, може бути наслідком прямого впливу АФО та АФН на молекулу ензиму з подальшою зміною структури та функцій.

Екстракти плодів дерену справжнього виявляли позитивний вплив на стан антиоксидантної системи за діабету, підвищуючи активність окремих ензимів антиоксидантного захисту та знижуючи вміст маркерних показників оксидативного стресу.

Ми припускаємо, що антиоксидантний потенціал екстрактів плодів дерену пов’язаний зі здатністю флавоноїдів в його складі безпосередньо знешкоджувати АФО. Антиоксидантні сполуки проявляють свої властивості через різні механізми: перенесення атома гідрогену, одноелектронного перенесення і завдяки здатності хелатувати перехідні метали, які відіграють важливу роль у метаболізмі кисню та утворенні АФО. Окрім того, флавоноїди проявляють свою антиоксидантну здатність внаслідок інгібування ензимів, які залучені в генеруванні вільних радикалів (ксантиноксидаза, ліпоксигеназа, протеїнкіназа С, циклооксигеназа, мікросомальна монооксигеназа, мітохондріальна сукциноксидаза та НАДФН-оксидаза) та активації ферментів АОС [14; 71].

Позитивний вплив на активність СОД за ЦД спостерігали лише у разі введення екстрактів червоних плодів дерену справжнього. СОД – фермент першої лінії захисту, який відіграє важливу роль у знешкодженні вільних радикалів.

Прооксидантно-антиоксидантний дисбаланс у напрямку надпродукції АФО та NO призводить до інтенсивного утворення пероксинітриту в лейкоцитах щурів із ЦД. Супероксид-аніон реагує з NO в 3-5 разів швидше, ніж відбувається процес дисмутації $O_2^{\bullet-}$, який каталізує СОД. Пероксинітрит може інактивувати СОД внаслідок нітрування білкової структури, утворення дитирозинових зшивок і руйнування комплексу Cu, Zn [37]. Саме тому, екстракт червоних плодів *Cornus mas* L., який, на відміну від інших досліджуваних екстрактів, містить в своєму складі антоціани та похідні кемпферолу, виявляв потужніший захисний ефект щодо ензимів АОС від негативного впливу оксидативного стресу.

Аналізуючи результати наших досліджень, ми виявили, що логанова кислота також має антиоксидантні властивості, хоча про механізм її антиоксидантної дії, як і інших іридоїдних глікозидів, відомо небагато. Abirami та ін. свідчать, що логанова кислота здатна виступати в ролі скавенджера вільних радикалів [2]. Інші дослідження виявили, що іридоїди з ліофілізованого водного екстракту Ajuga iva (Ai) зменшували прояви оксидативного стресу і запобігали ПОЛ у гіперхолестеринемічних щурів [24].

Водночас, роль іридоїдних глікозидів у зменшенні шкідливого впливу оксидативного стресу на клітини може бути опосередкована й іншим механізмом. Відомо, що оксидативний стрес та запалення – це пов’язані між собою процеси, а прозапальні цитокіни ІЛ-6 та ФНП-α можуть стимулювати утворення АФО. Kang та ін. [103] виявили, що іридоїдні глікозиди можуть інгібувати експресію генів ІЛ-6, ФНП-α, С-реактивного білка та утворення МДА і підвищувати рівень СОД у печінці за експериментального діабету.

Іншим маркером окиснювальної модифікації білків є кінцеві продукти їх оксидації. Як вже згадувалось вище, AOPPs утворюються під час оксидативного стресу внаслідок реакції білків крові з HOCl та хлорамінами. Окрім того, що AOPPs утворюються внаслідок хронічного оксидативного стресу, вони теж можуть спричиняти подальшу надпродукцію АФО у різних клітинах, активуючи НАДФН-оксидази. Цікаво, що ми виявили зростання рівня AOPPs в плазмі та зниження цього показника в лейкоцитах за діабету. Підвищення AOPPs в плазмі крові цілком

узгоджується з нашими попередніми результатами, які свідчать про розвиток оксидативного стресу за ЦД. Натомість результати, отримані у лейкоцитах потребують подальших досліджень.

Як відомо, основним джерелом HOCl є фермент мієлопероксидаза (рис. 4.1). Цей ензим каталізує реакцію H_2O_2, що утворюється під час "респіраторного вибуху", з іонами галогенів з утворенням сильних окисників, зокрема HOCl, HOBr та ін. Крім того, фізіологічним субстратом МПО також може бути NO, який відіграє роль ліганда для гемової групи. Ці реактивні сполуки можуть ініціювати ПОЛ в осередках запалення, спричиняючи модифікацію білків, включаючи галогенування, нітрування, окиснення і утворення зшивок (рис. 4.1) [242].

Ензим МПО є важливим елементом антибактеріальної активності фагоцитів, що забезпечує вроджений неспецифічний імунітет. *In vivo* цей фермент може вивільнятися в позаклітинну рідину (зокрема, в кров), у тому випадку, якщо з якої-небудь причини лейкоцит не здатний фагоцитувати мішень, у разі клітинного лізису або коли фагоцит піддається впливу різних стимулювальних факторів [242]. Під час запальних процесів рівень вільної МПО в крові підвищується. У наших експериментах ми виявили зростання активності цього ферменту в плазмі крові щурів з експериментальним ЦД, що й обумовлює підвищення вмісту AOPPs у плазмі (рис. 4.1). Натомість, активність МПО в лейкоцитах, активованих за діабету, знижувалась, що зумовлювало зменшення внутрішньоклітинного рівня AOPPs (рис. 4.1). Обмежена кількість досліджень розкриває взаємозв'язок між рівнем глікемії та активністю МПО. Sato та співавт. [187] виявили зниження активності цього ензиму в лейкоцитах хворих на ЦД і продемонстрували значну кореляцію між зменшенням активності МПО в лейкоцитах і підвищенням рівня HbA1*c*. A Unubol та ін. [208] зробили висновок, що зниження активності МПО у пацієнтів із погано контрольованим діабетом може бути спричинено негативною модуляцією ферментативної активності, пов'язаною з гіперглікемією.

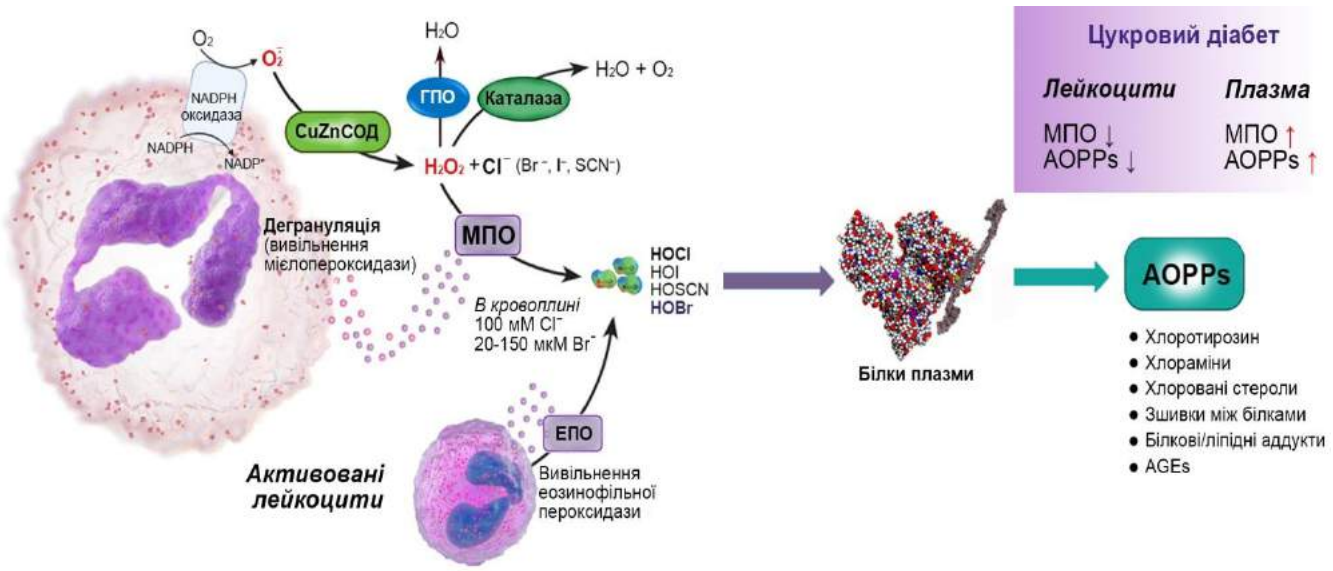


Рис. 4.1. Роль активованих лейкоцитів в утворенні кінцевих продуктів оксидації білків (AOPPs) плазми. Активовані лейкоцити способом секреторної дегрануляції вивільняють бактерицидні фактори, зокрема і мієлопероксидазу (МПО), у позаклітинне середовище. В процесі дегрануляції активується ензим НАДФН-оксидаза, який генерує супероксидний аніон ($O_2^{\bullet-}$). З двох молекул $O_2^{\bullet-}$ в реакції, що каталізується супероксиддисмутазою (СОД) формується H_2O_2. За участі H_2O_2 мієлопероксидаза окиснює іони галогенів (хлору чи брому) з утворенням сильного окисника – гіпохлоритної кислоти. Взаємодіючи з білками плазми крові, HOCl призводить до утворення та накопичення AOPPs

Екстракти червоних і жовтих плодів дерену справжнього, як ми описали раніше, містять сполуки з характерними гіпоглікемічними й антиоксидантними властивостями, що й сприяло зростанню активності МПО та нормалізації вмісту AOPPs в лейкоцитах за діабету. Покращення антиоксидантного статусу могло сприяти зменшенню вивільнення МПО в міжклітинний простір та зниження активності ензиму в плазмі крові.

Кінцеві продукти оксидації білків є не лише маркером розвитку захворювання, але також можуть активувати різні сигнальні шляхи, зокрема NF-κB та стимулювати вивільнення прозапальних і профібротичних факторів [29]. Свій вплив AOPPs здатні

реалізувати через зв'язування зі специфічним рецептором для AGEs – RAGE. Взаємодія RAGE-ліганд є одним з ключових механізмів розвитку ускладнень за діабету.

Згідно з результатами наших досліджень ми виявили зростання рівня кінцевих продуктів глікації в плазмі крові щурів з експериментальним ЦД, що пов'язано з тривалим станом гіперглікемії в організмі. Крім того, збільшення концентрації AGEs може бути зумовлено зниженою здатністю їх метаболізувати та / або екскретувати. Таким чином, ці продукти є маркерами контролю глікемії в тканинах організму [219].

Посилення неферментативного глікозилювання білків крові має прямий негативний ефект і може спричиняти утворення зшивок, зміни періоду напіввиведення білка, порушення зв'язування лігандів та активності ензимів. Окрім того, взаємодія AGE–RAGE обумовлює активацію безлічі внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема й стимулює формування АФО за участі НАДФН-оксидаз. Це може бути однією з причин розвитку оксидативного стресу в лейкоцитах крові щурів з ЦД у наших дослідженнях (рис. 4.2). Вчені дослідили, що зменшення вмісту GSH, яке виявляють за оксидативного стресу, призводить до зниження активності гліоксилази I, основного ензиму, який бере участь у детоксикації метилгліоксалю. Це, в результаті, підтримує подальше формування AGEs. Ми виявили також, що експериментальний діабет у тварин супроводжувався незначним, проте достовірним зростанням рівня RAGE у плазматичній мембрані лейкоцитів. У нормі RAGE майже повсюдно експресується в організмі, як правило, на низьких рівнях, проте його експресія посилюється за різних патологічних умов [80].

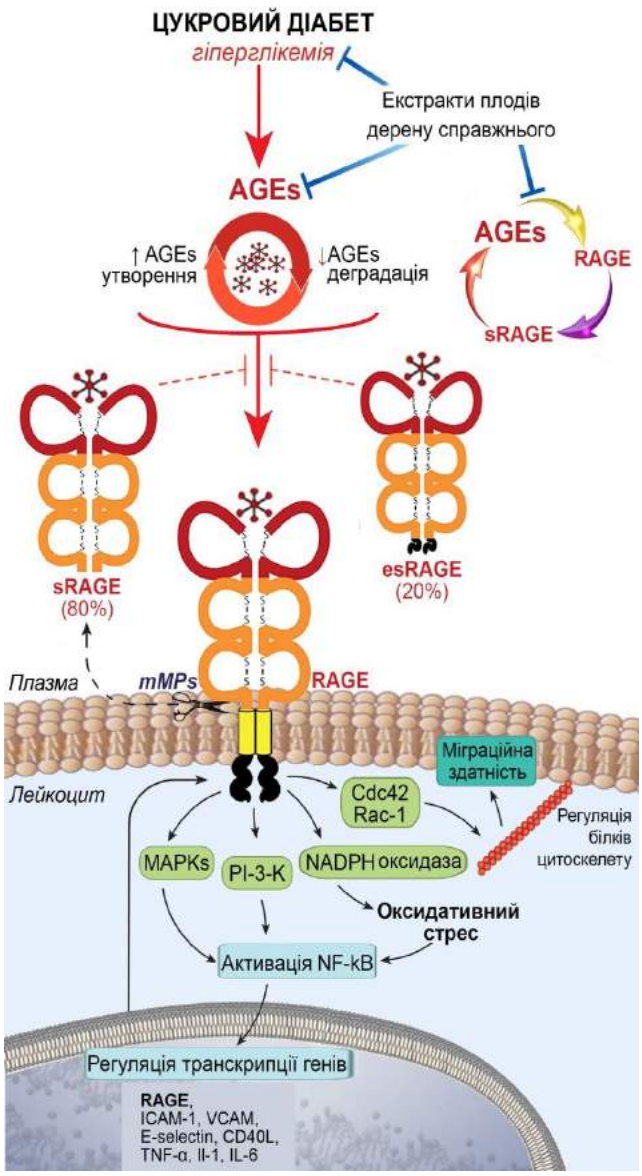


Рис. 4.2. Вплив кінцевих продуктів глікації (AGEs), утворених за гіперглікемії, на рівень циркулюючих у плазмі крові рецепторів (sRAGE) та зв'язаних з мембраною лейкоцитів рецепторів (RAGE) до них. Екстракти плодів дерену справжнього, знижуючи рівень AGEs, розривають петлю позитивного зворотного зв'язку AGEs → RAGE → sRAGE

Також ми дослідили рівень розчинної форми рецептора для AGE у плазмі крові щурів і виявили тенденцію до зростання його вмісту. Відомо, що у хворих на ЦД підвищена концентрація sRAGE позитивно корелює з наявністю ішемічної хвороби серця та біомаркерів запалення, таких як ФНП-α, моноцитарний хемотаксичний білок-1 і розчинні молекули адгезії судинних клітин-1. Інші дослідження припускають, що концентрація sRAGE може зростати у відповідь на збільшення вмісту циркулюючих AGEs. Оскільки AGEs позитивно регулюють експресію RAGE в декількох тканинах, а sRAGE може утворюватися внаслідок злущування RAGE з поверхні клітин за участі матриксних металопротеїназ, тому sRAGE може позитивно асоціюватися з циркулюючими AGEs (рис. 4.2). В цьому разі припускають, що рівень sRAGE може відображати активну експресію RAGE у

тканинах. Отже, це може пояснити деякі суперечності щодо рівня різних ізоформ рецепторів RAGE за діабету (рис. 4.2), хоча механізм досі невідомий [156].

Натомість, ми спостерігали зниження вмісту AGEs в лейкоцитах крові щурів із ЦД. Такі результати можна пояснити тим, що глікозилювання є спонтанною реакцією і залежить від періоду напіввиведення білка, ступеня та тривалості гіперглікемії і проникності клітин чи тканини для вільної глюкози [108]. Ми можемо припустити, що такі зміни рівня AGEs можуть бути пов'язані з порушенням транспорту глюкози всередину лейкоцитів за діабету (п. 3.6).

Запобігання утворенню або зменшення рівня AGEs має терапевтичний потенціал для уповільнення прогресування діабетичних ускладнень. Нами було виявлено, що екстракти червоних і жовтих плодів дерену справжнього сприяли зниженню рівня AGEs в плазмі крові щурів з ЦД. Можливим механізмом, за допомогою якого ці екстракти впливають на рівень AGEs є їх здатність проявляти антиоксидантні властивості. Як свідчать дані літератури, оксидативний стрес та накопичення AGEs тісно пов'язані між собою, зокрема важливу роль відіграє супероксид аніон [215]. Також, зниження рівня AGEs може відображати здатність екстрактів впливати на концентрацію глюкози у крові. Ми виявили, що лише екстракт червоних плодів дерену, який виявляв кращий гіпоглікемічний ефект, сприяв зменшенню кількості рецепторів до AGE (flRAGE та sRAGE). Цей екстракт знижував рівень циркулюючих AGEs в плазмі крові, що, імовірно, й призвело до супутнього зниження sRAGE (рис. 4.2).

Як вже згадано, надмірна концентрація глюкози в крові призводить до інтенсифікації процесів неферментативного глікозилювання макромолекул, зміни активності метаболічних шляхів, розвитку оксидативного стресу та супутніх порушень. Проте, глюкоза також є одним з основних джерел енергії, що необхідна для функціонування клітин. Саме тому, таким важливим є підтримання її рівня в межах фізіологічної норми, забезпечення нормального транспортування всередину клітин і метаболізму. Ми виявили зниження поглинання глюкози лейкоцитами крові за ЦД, що може бути причиною порушення функціонування цих клітин в умовах патології (рис. 4.3*А* і *Б*). В лейкоцитах збільшення використання глюкози є

важливим для здійснення ними імунної відповіді, і це залежить від функції конкретних ізоформ транспортера глюкози (GLUT). У плазматичній мембрані лейкоцитів GLUT1 забезпечує базальний транспорт глюкози, тоді як GLUT3 і GLUT4 транспортують глюкозу у відповідь на стимулювальний вплив інсуліну. Регулювання GLUT1 забезпечує достатню кількість глюкози для основних метаболічних потреб. Транспортери GLUT4 та GLUT3 мають вищу спорідненість до глюкози, що дає змогу імунним клітинам конкурувати з іншими клітинами, коли її концентрація в мікросередовищі відносно низька [141]. Водночас, за гіперглікемії спостерігається порушення функціонування транспортерів глюкози [125], що може бути однією з причин зниження поглинання глюкози лейкоцитами.

Натомість, введення екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти сприяло нормалізації транспорту глюкози всередину клітин (рис. 4.3*В*). Ефект препаратів міг бути зумовлений позитивним впливом на лейкоцити за ЦД, пов’язаним зі зниженням оксидативного стресу та запальних процесів і, як наслідок, полегшенням супутніх метаболічних порушень. Деякі дослідження підтвердили, що група лікарських рослин, таких як Aegle marmelose (L.) Correa ex Roxb, Syzyzium cumini (L.) Skeel. [8], Al-lium sativum L. [191], Canna indica L. [176], Lagerstroemia speciosa (L.) Pers. [117] та *Cornus officinalis* Siebold. & Zucc. [218] сприяли ефективному транспортуванню GLUT до плазматичної мембрани, в результаті чого глюкоза транспортується до клітин і її концентрація в крові зменшується.

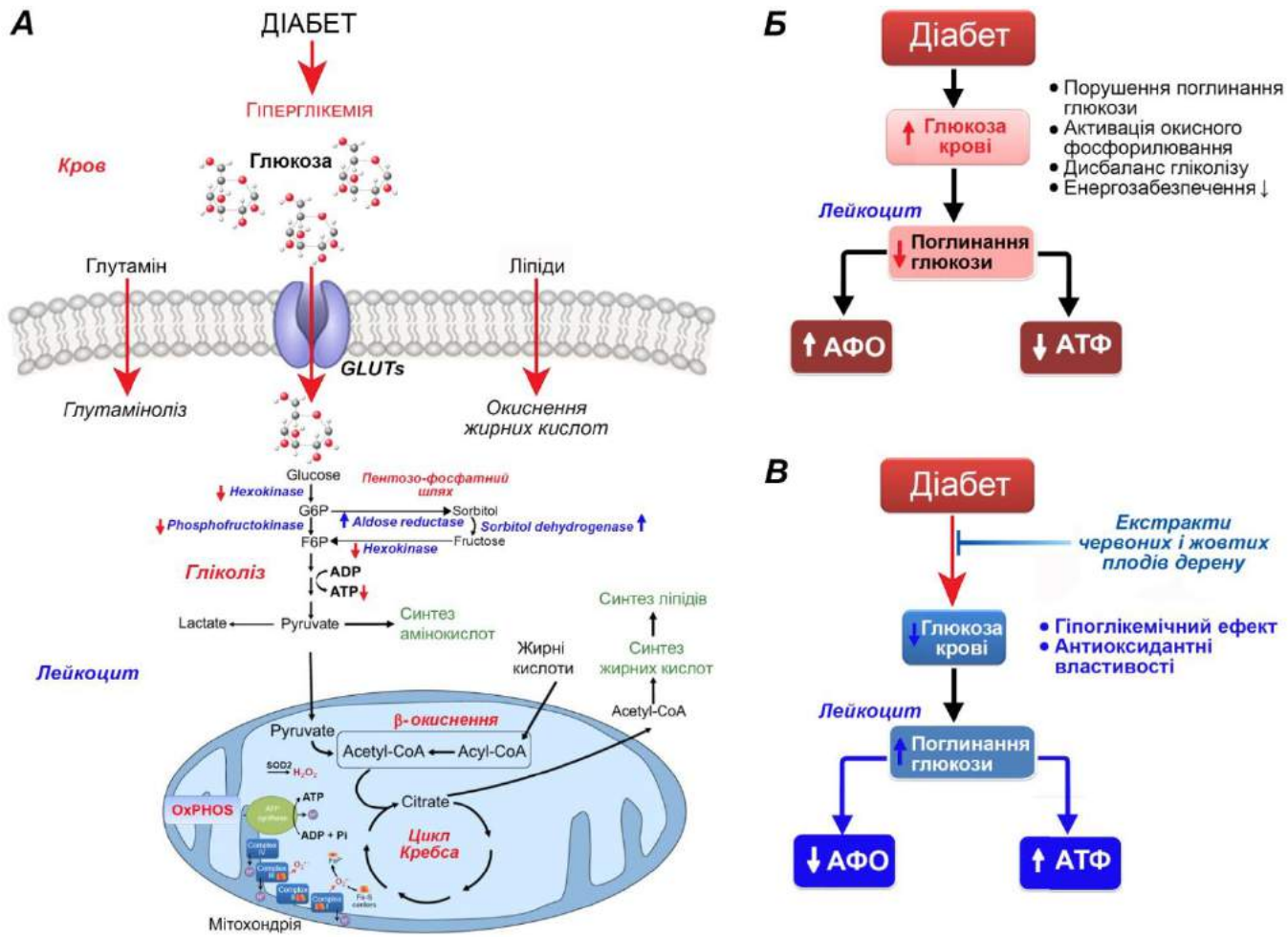


Рис. 4.3. Схема метаболічного профілю лейкоцитів за цукрового діабету (*А*). Зниження поглинання глюкози лейкоцитами крові за діабету на фоні порушення функціонування ключових ензимів гліколізу та посилення процесів окисного фосфорилювання призводить до порушення енергозабезпечення цих клітин (*Б*). Екстракти плодів дерену справжнього виявляють гіпоглікемічний та антиоксидантний ефекти, а також нормалізують поглинання глюкози лейкоцитами та сприяють підвищенню рівня АТФ (*В*)

Цікаво, що Byung Geun На та інші встановили, що однією з мішеней дії досліджуваного ними терапевтичного препарату були АМФК та mTOR (з англ. Mechanistic target of rapamycin kinase), регулювання яких призводило до підвищення поглинання глюкози клітинами м’язів. АМФК є головним регулятором гомеостазу в метаболізмі глюкози та ліпідів. Як правило, активована АМФК стимулює катаболічні шляхи, такі як гліколіз, окиснення жирних кислот і біогенез

мітохондрій, та інгібує такі анаболічні шляхи, як глюконеогенез, синтез глікогену, жирних кислот і білка [88]. АМФК також здатна стимулювати поглинання глюкози шляхом активації GLUT1. Як ми вже згадували, флавоноїди, зокрема кверцетин та деякі антоціани, є природними індукторами активності АМФК [39; 224]. Зокрема, встановлено, що кверцетин та його метаболіти стимулювали фосфорилювання АМФК в клітинах скелетних м'язів C2C12, що призводило до посиленого засвоєння глюкози м'язовими клітинами [61]. Також було досліджено, що логанова кислота проявляє високу здатність до активації АМФК, діючи як прямий агоніст ензиму, зв'язуючись із сайтами зв'язування АМФ у субодиниці гамма та / або іншими ділянками взаємодії між гамма та бета субодиницями [155]. Huang та інші [97] виявили, що введення препарату *Cornus officinalis* сприяло посиленню фосфорилювання АМФК та загальної експресії АМФК залежно від дози у тварин з експериментальним колаген-індукованим артритом. *Cornus officinalis* та *Cornus mas* L. мають подібний компонентний склад, що свідчить про можливий схожий ефект на АМФК та, відповідно, поглинання глюкози.

Критичне значення достатнього надходження глюкози в лейкоцити підкреслюється спостереженнями, що зниження клітинного імунітету у осіб, які страждають на гіперліпідемію, діабет, атеросклероз, інфекції або деякі типи раку, пов'язане з порушенням транспорту глюкози в імунні клітини [118]. Зростання утилізації глюкози лейкоцитами крові потрібне для забезпечення підвищених потреб у енергії та утворення проміжних продуктів для синтезу макромолекул, які необхідні для реалізації клітинами їхніх функцій. Відомо, що синтез АТФ в лейкоцитах значною мірою залежить від шляху деградації глюкози. За генерацію АТФ із глюкози в клітині відповідають три основні взаємопов'язані метаболічні шляхи: гліколіз, цикл трикарбонових кислот та окисне фосфорилювання (рис. 4.3*A*). Після активації лейкоцити перемикають свій метаболічний профіль від окисного фосфорилювання на гліколіз. На відміну від окисного фосфорилювання, у процесі гліколізу утворюється лише невелика кількість АТФ, тому достатнє генерування АТФ потребує посиленого споживання глюкози. Якщо транспорт глюкози і, отже,

гліколітичний шлях змінюються, то це може призводити до порушення забезпечення лейкоцитів енергією та зміни їх функцій (рис. 4.3*А* і *Б*) [125].

Водночас відомо, що за гіперглікемії в умовах ЦД глюкоза перетворюється на сорбітол поліоловим шляхом (рис. 4.3*А*). Калорійність глюкози становить 3,9 ккал/г, а сорбітолу – 2,4 ккал/г. Така різниця в енергії, що утворюється внаслідок метаболізму глюкози та сорбітолу, може спричиняти зміну вмісту АТФ і, як наслідок, активності лейкоцитів [139].

Введення досліджуваних екстрактів тваринам з ЦД сприяло зростанню рівня АТФ в лейкоцитах крові. Ми припускаємо, що підвищення даного показника може бути обумовлене нормалізацією поглинання глюкози клітинами у відповідь на введення екстрактів, як було описано та пояснено вище (рис. 4.3).

Отже, ефективну дію екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти підтверджено комплексними дослідженнями їх біологічних ефектів на рівень глікемії та здатність прямо чи опосередковано нівелювати функціональні та метаболічні порушення лейкоцитів у щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД (рис. 4.3*В*). Встановлений нами спектр біологічних ефектів досліджуваних екстрактів зумовлений наявністю у їхньому складі біологічно активних сполук, здатних проявляти різноманітні властивості.

Зміна досліджуваних нами показників за експериментального ЦД у відповідь на введення екстрактів зумовлена їх здатністю впливати на рівень глюкози (гіпоглікемічний ефект) та антиоксидантною дією, а також може бути наслідком інших встановлених властивостей його компонентів (рис. 4.4).

Рис. 4.4. Підсумкова схема ефектів екстрактів плодів дерену справжнього на показники глікемічного профілю, рівень про-/антиоксидантих біомаркерів, функціональні та метаболічні зміни в лейкоцитах периферичної крові щурів за стрептозотоцинового цукрового діабету

На основі вищезгаданих даних можна стверджувати, що отримані екстракти на основі плодів *Cornus mas* L. можуть бути перспективними у терапії хворих на ЦД 1 та 2 типів, а також захворювань, пов’язаних з порушення про-/антиоксидантного балансу. Водночас, аналізуючи всі отримані результати досліджень можна стверджувати (рис. 4.4), що біологічна дія екстрактів плодів, які містять у своєму складі значну кількість сполук, сильніша ніж екстракт логанової кислоти, який, в основному, складається з ізомерів одного іридоїдного глікозиду.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено антидіабетичний та антиоксидантний ефекти екстрактів червоних і жовтих плодів *Cornus mas* L. та логанової кислоти, а також їхній позитивний вплив на функціональний стан лейкоцитів, нормалізацію їх про-/антиоксидантного статусу та метаболічних процесів за експериментального цукрового діабету.

1. Проаналізовано якісний та кількісний склад екстрактів плодів *Cornus mas* L. та встановлено відмінності в їх компонентному співвідношенні. Екстракт жовтих плодів характеризувався відсутністю антоціанів і похідних кемпферолу, на відміну від екстракту червоних плодів. У складі екстракту “Логанова кислота” ізомери логанової кислоти становили 97,6% від загальної кількості біоактивних сполук, решта – кафтарова кислота. Концентрація логанової кислоти у екстракті є приблизно в 5 та 7 разів вищою, ніж в екстрактах жовтих і червоних плодів дерену справжнього, відповідно.
2. Встановлено гіпоглікемічну дію екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів, натомість екстракт логанової кислоти не спричиняв зниження концентрації глюкози у крові та вмісту глікозильованого гемоглобіну. Виявлено інгібіторний ефект екстрактів плодів дерену справжнього на активність α-глюкозидази *in vitro*, як можливий механізм гіпоглікемічної дії екстрактів. Екстракт червоних плодів проявляє сильніші інгібувальні властивості, ніж екстракт жовтих плодів дерену справжнього. Інгібувальна дія логанової кислоти на активність α-глюкозидази була значно слабшою порівняно з екстрактами червоних і жовтих плодів дерену. Доведено, що екстракти жовтих і червоних плодів проявляли змішаний, а логанова кислота – неконкурентний тип інгібування активності α-глюкозидази.
3. Виявлено, що екстракти плодів дерену справжнього сприяли приросту маси тіла у щурів з експериментальним ЦД. Встановлено підвищення середнього вмісту гемоглобіну в одному еритроциті за введення екстракту жовтих плодів

дерену та логанової кислоти, а також зростання концентрації гемоглобіну у щурів, які отримували екстракт “Логанова кислота”.

4. Екстракти червоних і жовтих плодів дерену проявляли антиоксидатний ефект *in vitro*, інгібуючи окиснення фосфоліпідів ліпосом, індукованого фізичними та хімічними чинниками. Досліджувані екстракти ефективніше захищали модельні ліпідні мембрани від вільних радикалів, утворених за термічного розкладання сполуки ААРН, ніж від окиснення, індукованого за впливу ультрафіолетового випромінювання типу В.
5. Введення екстрактів плодів дерену справжнього та логанової кислоти зменшує прояви оксидативного стресу у крові щурів з ЦД, що відображалось у зниженні утворення АФО, зменшенні інтенсивності процесів окисної модифікації білків і перекисного окиснення ліпідів, а також сприяє підвищенню активності окремих ферментів антиоксидантної системи захисту.
6. Застосування екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього тваринам зі стрептозотоцин-індукованим ЦД зумовлювало зниження у плазмі вмісту кінцевих продуктів глікації, проте лише екстракт червоних плодів дерену спричиняв зниження рецепторів до них (RAGE), експонованих на мембрані лейкоцитів і розчинних у плазмі крові, що зумовлено гіпоглікемічними й антиоксидантними властивостями цього екстракту.
7. За стрептозотоцин-індукованого ЦД у щурів виявлено зниження транспорту глюкози в лейкоцити, що, ймовірно, було причиною зменшення внутрішньоклітинного рівня АТФ. Введення екстрактів червоних і жовтих плодів дерену справжнього та логанової кислоти тваринам зі стрептозотоцин-індукованим ЦД посилювало поглинання глюкози лейкоцитами та обумовлювало підвищення рівня АТФ в цих клітинах крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Aba, P. E., & Asuzu, I. U. (2018). Mechanisms of actions of some bioactive anti-diabetic principles from phytochemicals of medicinal plants: A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *9*, 85–96.
2. Abirami, A., Sinsinwar, S., Rajalakshmi, P., Brindha, P., Rajesh, Y. B. R. D., & Vadivel, V. (2019). Antioxidant and cytoprotective properties of loganic acid isolated from seeds of Strychnos potatorum L. against heavy metal induced toxicity in PBMC model. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–11. https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1681445
3. Adebajo, A. C., Ayoola, M. D., Odediran, S. A., Aladesanmi, A. J., Schmidt, T. J., & Verspohl, E. J. (2013). Evaluation of ethnomedical claim III: anti-hyperglycemic activities of Gongronema latifolium root and stem. *Journal of Diabetes*, *5*(3), 336–343. https://doi.org/10.1111/1753-0407.12019
4. Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *67*(1), 3–21. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004
5. Alba-Loureiro, T. C., Munhoz, C. D., Martins, J. O., Cerchiaro, G. A., Scavone, C., Curi, R., & Sannomiya, P. (2007). Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *40*(8), 1037–1044. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000143
6. Alfavitskyi O., Dzydzan O., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, April 27–29). Effect of extracts obtained from the *Cornus mas* L. fruits on the level of reactive oxygen species and oxidatively modified proteins in leukocytes under conditions of streptozotocin-induced diabetes [Oral presentation]. XVI International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 75th anniversary of the Faculty of Biology of Ivan Franko National University of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M. P. Derkach, Lviv, Ukraine, 40.
7. American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, *37 Suppl 1*, S81-90. https://doi.org/10.2337/dc14-S081

8. Anandharajan, R., Jaiganesh, S., Shankernarayanan, N. P., Viswakarma, R. A., & Balakrishnan, A. (2006). In vitro glucose uptake activity of Aegles marmelos and Syzygium cumini by activation of GLUT-4, PI3 kinase and PPARgamma in L6 myotubes. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *13*(6), 434–441. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.03.008
9. Araújo, R. F. F. de, Martins, D. B. G., & Borba, M. A. C. S. M. (2016). Oxidative Stress and Disease. In J. A. Morales-Gonzalez, A. Morales-Gonzalez, & E. O. Madrigal-Santillan (Eds.), *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2*. InTech. https://doi.org/10.5772/65366
10. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. https://doi.org/10.1155/2014/360438
11. Ayepola, O. R., Brooks, N. L., & Oguntibeju, O. O. (2014). *Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/57282
12. Bagdade, J. D., Root, R. K., & Bulger, R. J. (1974). Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*, *23*(1), 9–15. https://doi.org/10.2337/diab.23.1.9
13. Bajpai, A., & Tilley, D. G. (2018). The Role of leukocytes in diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1547. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01547
14. Banjarnahor, S. D. S., & Artanti, N. (2015). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, *23*(4), 239–244. https://doi.org/10.13181/mji.v23i4.1015
15. Bartesaghi, S., & Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*, *14*, 618–625. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009

16. Basta, G. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research*, *63*(4), 582–592. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.001
17. Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *87*(1), 245–313. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005
18. Bermont, F., Hermant, A., Benninga, R., Chabert, C., Jacot, G., Santo-Domingo, J., Kraus, M. R.-C., Feige, J. N., & De Marchi, U. (2020). Targeting Mitochondrial Calcium Uptake with the Natural Flavonol Kaempferol, to Promote Metabolism/Secretion Coupling in Pancreatic β-cells. *Nutrients*, *12*(2), 538. https://doi.org/10.3390/nu12020538
19. Betigeri, S., Thakur, A., & Raghavan, K. (2005). Use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs. *Pharmaceutical Research*, *22*(2), 310–317. https://doi.org/10.1007/s11095-004-1199-x
20. Bhattamisra, S. K., Yap, K. H., Rao, V., & Choudhury, H. (2020). Multiple Biological Effects of an Iridoid Glucoside, Catalpol, and Its Underlying Molecular Mechanisms. *Biomolecules*, *10*(1), 32. https://doi.org/10.3390/biom10010032
21. Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M., & Nawroth, P. P. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, *83*(11), 876–886. https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7
22. Bila, I., Dzydzan, O., Brodyak, I., & Sybirna, N. (2019). Agmatine prevents oxidative-nitrative stress in blood leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Open Life Sciences*, *14*(1), 299–310. https://doi.org/10.1515/biol-2019-0033
23. Bonora, E., & Tuomilehto, J. (2011). The pros and cons of diagnosing diabetes with A1C. *Diabetes Care*, *34*(Supplement 2), S184–S190. https://doi.org/10.2337/dc11-s216
24. Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A., & Bouchenak, M. (2010). Iridoid extracts from Ajuga iva increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells

of rats fed a cholesterol-rich diet. *Nutrition Research* (New York, N.Y.), *30*(5), 358–365. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.05.004

25. Breusing, N., & Grune, T. (2010). Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Experimental Gerontology*, *45*(10), 733–737. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.04.004
26. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, *414*(6865), 813–820. https://doi.org/10.1038/414813a
27. Buckley, S. T., & Ehrhardt, C. (2010). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2010*, 917108. https://doi.org/10.1155/2010/917108
28. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302–310. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6
29. Cao, W., Hou, F. F., & Nie, J. (2014). AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney International Supplements*, *4*(1), 102–106. https://doi.org/10.1038/kisup.2014.19
30. Chen, H., Xiong, L., Wang, N., Liu, X., Hu, W., Yang, Z., Jiang, Y., Zheng, G., Ouyang, K., & Wang, W. (2018). Chimonanthus nitens Oliv. leaf extract exerting anti-hyperglycemic activity by modulating GLUT4 and GLUT1 in the skeletal muscle of a diabetic mouse model. *Food & Function*, *9*(9), 4959–4967. https://doi.org/10.1039/C8FO00954F
31. Chen, J.-H., Lin, X., Bu, C., & Zhang, X. (2018). Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies. *Nutrition & Metabolism*, *15*(1), 72. https://doi.org/10.1186/s12986-018-0306-7
32. Chibber, R., Ben-Mahmud, B. M., Chibber, S., & Kohner, E. M. (2007). Leukocytes in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews*, *3*(1), 3–14. https://doi.org/https://doi.org/10.2174/157339907779802139
33. Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jorns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many

differences, few similarities. *Diabetes*, *54 Suppl 2*, S97–S107. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.S97

34. Collison, K. S., Parhar, R. S., Saleh, S. S., Meyer, B. F., Kwaasi, A. A., Hammami, M. M., Schmidt, A. M., Stern, D. M., & Al-Mohanna, F. A. (2002). RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *Journal of Leukocyte Biology*, *71*(3), 433–444.
35. Coppieters, K. T., Boettler, T., & von Herrath, M. (2012). Virus infections in type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(1), a007682. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007682
36. Czerwińska, M. E., & Melzig, M. F. (2018). *Cornus mas* and *Cornus Officinalis* – Analogies and Differences of Two Medicinal Plants Traditionally Used. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 894. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00894
37. Daiber, A., Daub, S., Bachschmid, M., Schildknecht, S., Oelze, M., Steven, S., Schmidt, P., Megner, A., Wada, M., Tanabe, T., Münzel, T., Bottari, S., & Ullrich, V. (2013). Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite—strategies to prevent these oxidative modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 7542–7570. https://doi.org/10.3390/ijms14047542
38. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, *329*(1–2), 23–38. https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2
39. Danielewski, M., Matuszewska, A., Nowak, B., Kucharska, A. Z., & Sozański, T. (2020). The effects of natural iridoids and anthocyanins on selected parameters of liver and cardiovascular system functions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–12. https://doi.org/10.1155/2020/2735790
40. Darmaun, D., Smith, S. D., Sweeten, S., Sager, B. K., Welch, S., & Mauras, N. (2005). Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes*, *54*(1), 190–196. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.190
41. David, L., Danciu, V., Moldovan, B., & Filip, A. (2019). Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant capacity and anthocyanin content of

cornelian cherry fruit extract. *Antioxidants*, *8*(5), 114. https://doi.org/10.3390/antiox8050114

42. Delmastro, M. M., & Piganelli, J. D. (2011). Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clinical and Developmental Immunology*, *2011*, e593863. https://doi.org/10.1155/2011/593863
43. Demkovych, A., Bondarenko, Y., & Hasiuk, P. A. (2017). Oxidative modification of proteins in the process of experimental periodontitis development. *Interventional Medicine & Applied Science*, *9*(4), 218–221. https://doi.org/10.1556/1646.9.2017.28
44. Deng, S., West, B. J., & Jensen, C. J. (2013). UPLC-TOF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in *Cornus mas* fruit. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 1–7. https://doi.org/10.1155/2013/710972
45. Deutschländer, M. S., Lall, N., Van de Venter, M., & Hussein, A. A. (2011). Hypoglycemic evaluation of a new triterpene and other compounds isolated from Euclea undulata Thunb. var. myrtina (Ebenaceae) root bark. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(3), 1091–1095. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.038
46. Diamanti-Kandarakis, E., Piperi, C., Patsouris, E., Korkolopoulou, P., Panidis, D., Pawelczyk, L., Papavassiliou, A. G., & Duleba, A. J. (2007). Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochemistry and Cell Biology*, *127*(6), 581–589. https://doi.org/10.1007/s00418-006-0265-3
47. Dilworth, L., Facey, A., & Omoruyi, F. (2021). Diabetes mellitus and its metabolic complications: the role of adipose tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14), 7644. https://doi.org/10.3390/ijms22147644
48. Dinda, B., Kyriakopoulos, A. M., Dinda, S., Zoumpourlis, V., Thomaidis, N. S., Velegraki, A., Markopoulos, C., & Dinda, M. (2016). *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. *Journal of Ethnopharmacology*, *193*, 670–690. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.042

49. Dzydzan O., Bila I., Babiy D., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Changes of blood system's indicators in the experimental diabetes mellitus under *per os* administration of extracts from cornelian cherry (*Cornus mas* L.) [Oral presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 58.
50. Dzydzan, O., Bila, I., Kucharska, A. Z., Brodyak, I., & Sybirna, N. (2019). Antidiabetic effects of extracts of red and yellow fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Food & Function*, *10*(10), 6459–6472. https://doi.org/10.1039/C9FO00515C
51. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, June 20–21). Effect of extract from red fruits of *Cornus mas* L. on the state of antioxidant defence system in leukocytes under experimental diabetes mellitus [Abstracts]. Eighth International Conference on "Quality and safety in food production chain", Wrocław, Poland, 32–33.
52. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2019, April 9–11). Effect of extract from yellow fruits of *Cornus mas* L. on the markers of antioxidant system in rats' blood leukocytes under conditions of streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XV International scientific conference for students and PhD students "Youth and progress of biology", dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas, Lviv, Ukraine, 40.
53. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2019, May 20–24). The Effect of the Iridoid – Loganic Acid from the *Cornus mas* L. fruits on plasma markers of oxidation stress in streptozotocin-induced diabetic rats [Symposium]. Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 358.
54. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 16–20). Infuence of *Cornus mas* L. extracts and loganic acid on blood erythrocytes under experimental diabetes mellitus [Symposium]. Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 253.

55. Dzydzan, O., Brodyak, I., Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A. Z., & Sybirna, N. (2020). Loganic acid, an iridoid glycoside extracted from *Cornus mas* L. fruits, reduces of carbonyl/oxidative stress biomarkers in plasma and restores antioxidant balance in leukocytes of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life*, *10*(12), 349. https://doi.org/10.3390/life10120349
56. Dzydzan O., Chaban M., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). Glucose transport and ATP content in leukocytes under administration of *Cornus mas* L. fruit extracts to animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Conference presentation]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", Lviv, Ukraine, 55–56.
57. Dzydzan O. Kalanova S., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). An *in vitro* evaluation of hypoglycaemic potential of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits' extracts [Abstract]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", Lviv, Ukraine, 56.
58. Dzydzan O., Kuchurka O., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). The extracts of *Cornus mas* L. fruits prevent the development of carbonyl stress in blood plasma of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Conference presentation]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", Lviv, Ukraine, 57.
59. Dzydzan O. Moroz A., Seniv M., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, October 1–2). Effect of iridoids and anthocyanins from the *Cornus mas* L. fruits on the antioxidant defense system in leukocytes under experimental diabetes mellitus. [Abstracts]. Fifth International Scientific Conference "Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology", Dnipro, Ukraine, 95–96.
60. Eid, H. M., & Haddad, P. S. (2014). Mechanisms of action of indigenous antidiabetic plants from the boreal forest of northeastern Canada. *Advances in Endocrinology*, e272968. https://doi.org/10.1155/2014/272968
61. Eid, H. M., Martineau, L. C., Saleem, A., Muhammad, A., Vallerand, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Nistor, L., Afshar, A., Arnason, J. T., & Haddad, P. S. (2010). Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose

uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant Vaccinium vitis-idaea. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(7), 991–1003. https://doi.org/10.1002/mnfr.200900218

62. Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, *12*(1), 60. https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60
63. Ernsberger, P., & J., R. (2012). The glucose tolerance test as a laboratory tool with clinical implications. In *S. Chackrewarthy (Ed.), Glucose Tolerance. InTech*. https://doi.org/10.5772/54785
64. Fadel, O., El Kirat, K., & Morandat, S. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1808*(12), 2973–2980. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.011
65. Fakhruddin, S., Alanazi, W., & Jackson, K. E. (2017). Diabetes-induced reactive oxygen species: mechanism of their generation and role in renal injury. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 1–30. https://doi.org/10.1155/2017/8379327
66. Farias, R. A., Rao, V. S., Viana, G. S., Silveira, E. R., Maciel, M. A., & Pinto, A. C. (1997). Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from Croton cajucara. *Planta Medica*, *63*(6), 558–560. https://doi.org/10.1055/s-2006-957766
67. Fernández-Durango, R., Fernández-Martínez, A., García-Feijoo, J., Castillo, A., Casa, J. M. de la, García-Bueno, B., Pérez-Nievas, B. G., Fernández-Cruz, A., & Leza, J. C. (2008). Expression of nitrotyrosine and oxidative consequences in the trabecular meshwork of patients with primary open-angle glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*(6), 2506–2511. https://doi.org/10.1167/iovs.07-1363
68. Filippi, C. M., & von Herrath, M. G. (2008). Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes*, *57*(11), 2863–2871. https://doi.org/10.2337/db07-1023

69. Fontana Pereira, D., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M. S. R. B., Guedes, A., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2011). Effects of flavonoids on α-glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, *27*(11–12), 1161–1167. https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.008
70. Fracasso, B. de M., Rangel, J. O., Machado, A. G., Curuja, F. S., Lopes, A., Olsen, V., Clausell, N., Biolo, A., Rohde, L. E., & Andrades, M. (2019). Characterization of advanced glycation end products and their receptor (RAGE) in an animal model of myocardial infarction. *PLOS ONE*, *14*(1), e0209964. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209964
71. Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In E. Shalaby (Ed.), *Antioxidants*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.85270
72. Gabrielska, J., Soczyńska-Kordala, M., Hładyszowski, J., Zyłka, R., Miśkiewicz, J., & Przestalski, S. (2006). Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7735–7746. https://doi.org/10.1021/jf060720a
73. Gabrusiewicz, K., Colwell, N. A., & Heimberger, A. B. (2017). The role of myeloid-derived suppressor cells in immunosuppression in brain tumors. In *Translational Immunotherapy of Brain Tumors* (pp. 63–82). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802420-1.00004-1
74. Gallelli, C., Calcagnini, S., Romano, A., Koczwara, J., de Ceglia, M., Dante, D., Villani, R., Giudetti, A., Cassano, T., & Gaetani, S. (2018). Modulation of the oxidative stress and lipid peroxidation by endocannabinoids and their lipid analogues. *Antioxidants*, *7*(7), 93. https://doi.org/10.3390/antiox7070093
75. Gallucci, S. (2016). An overview of the innate immune response to infectious and noninfectious stressors. In The innate immune response to noninfectious stressors (pp. 1–24). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801968-9.00001-5

76. Gannon, N. P., Conn, C. A., & Vaughan, R. A. (2015). Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: a mini-review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(1), 48–64. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400414
77. Gao, D., Li, Q., Gao, Z., & Wang, L. (2012). Antidiabetic effects of *Corni Fructus* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Medical Journal*, *53*(4), 691. https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.4.691
78. Geerlings, S. E., & Hoepelman, A. I. (1999). Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *26*(3–4), 259–265. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x
79. Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, *107*(9), 1058–1070. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
80. Gkogkolou, P., & Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermato-Endocrinology*, *4*(3), 259–270. https://doi.org/10.4161/derm.22028
81. Goldberg, D. M., & Spooner, R. J. (1983). Assay of Glutathione Reductase. In Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Edition (Vol. 3, pp. 258–265). Verlog Chemie.
82. Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, *114*(6), 597–605. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854
83. Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *65*(2–3), 45–80. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003
84. Graves, D., T. (2008). Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Frontiers in Bioscience*, *13*(13), 1227. https://doi.org/10.2741/2757
85. Gryszczyńska, B., Formanowicz, D., Budzyń, M., Wanic-Kossowska, M., Pawliczak, E., Formanowicz, P., Majewski, W., Strzyżewski, K. W., Kasprzak, M. P., & Iskra, M. (2017). Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as

biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated Diseases. *BioMed Research International*, *2017*, 1–9. https://doi.org/10.1155/2017/4975264

86. Guo, H., & Xia, M. (2018). Anthocyanins and diabetes regulation. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 135–145). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00012-X
87. Gutiérrez, M. E., García, A. F., Africa de Madariaga, M., Sagrista, M. L., Casadó, F. J., & Mora, M. (2003). Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sciences*, *72*(21), 2337–2360. https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00120-6
88. Ha, B. G., Park, J.-E., Shin, E. J., & Shon, Y. H. (2014). Modulation of glucose metabolism by balanced deep-sea water ameliorates hyperglycemia and pancreatic function in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS ONE*, *9*(7), e102095. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102095
89. Haddad, P., & Eid, H. (2017). The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(4), 355–364. https://doi.org/10.2174/0929867323666160909153707
90. Hamza, A. A., Saleh Ksiksi, T., & Ali A Shamsi, O. (2015). α-Glucosidase inhibitory activity of common traditional medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Developing Drugs*, *04*(05). https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000144
91. Han, Y., Jung, H. W., & Park, Y.-K. (2014). Selective therapeutic effect of *Cornus officinalis* fruits on the damage of different organs in stz-induced diabetic rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, *42*(05), 1169–1182. https://doi.org/10.1142/S0192415X14500736
92. Hatzioannou, A., Kanistras, I., Mantzou, E., Anastasiou, E., Peppa, M., Sarantopoulou, V., Lymberi, P., & Alevizaki, M. (2015). Effect of advanced glycation end products on human thyroglobulin's antigenicity as identified by the use of sera from patients with hashimoto's thyroiditis and gestational diabetes mellitus. *International Journal of Endocrinology*, *2015*, e849615. https://doi.org/10.1155/2015/849615

93. He, Y.-M., Zhu, S., Ge, Y.-W., Kazuma, K., Zou, K., Cai, S.-Q., & Komatsu, K. (2015). The anti-inflammatory secoiridoid glycosides from Gentianae Scabrae Radix: the root and rhizome of Gentiana scabra. *Journal of Natural Medicines*, *69*(3), 303–312. https://doi.org/10.1007/s11418-015-0894-8
94. Heier, M., Margeirsdottir, H. D., Gaarder, M., Stensæth, K. H., Brunborg, C., Torjesen, P. A., Seljeflot, I., Hanssen, K. F., & Dahl-Jørgensen, K. (2015). Soluble RAGE and atherosclerosis in youth with type 1 diabetes: A 5-year follow-up study. *Cardiovascular Diabetology*, *14*(1), 126. https://doi.org/10.1186/s12933-015-0292-2
95. Herold, K. C., Vignali, D. A. A., Cooke, A., & Bluestone, J. A. (2013). Type 1 diabetes: Translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. *Nature Reviews Immunology*, *13*(4), 243–256. https://doi.org/10.1038/nri3422
96. Huang, J., Xiao, Y., Xu, A., & Zhou, Z. (2016). Neutrophils in type 1 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*, *7*(5), 652–663. https://doi.org/10.1111/jdi.12469
97. Huang, L., Hu, S., Shao, M., Wu, X., Zhang, J., & Cao, G. (2021). Combined *Cornus officinalis* and Paeonia Lactiflora Pall Therapy Alleviates Rheumatoid Arthritis by Regulating Synovial Apoptosis via AMPK-Mediated Mitochondrial Fission. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 639009. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.639009
98. Huang, X.-Y., Fu, J.-F., & Di, D.-L. (2010). Preparative isolation and purification of steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni using high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, *71*(2), 220–224. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.11.025
99. Hudson, B. I., Kalea, A. Z., Del Mar Arriero, M., Harja, E., Boulanger, E., D'Agati, V., & Schmidt, A. M. (2008). Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(49), 34457–34468. https://doi.org/10.1074/jbc.M801465200
100. Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. (2019). Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, *8*(3), 72. https://doi.org/10.3390/antiox8030072

101. Kalousová, M., Skrha, J., & Zima, T. (2002). Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiological Research*, *51*(6), 597–604.
102. Kang, D. G., Moon, M. K., Lee, A. S., Kwon, T. O., Kim, J. S., & Lee, H. S. (2007). Cornuside suppresses cytokine-induced proinflammatory and adhesion molecules in the human umbilical vein endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *30*(9), 1796–1799. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1796
103. Kang, J., Guo, C., Thome, R., Yang, N., Zhang, Y., Li, X., & Cao, X. (2018). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of iridoid glycosides extracted from Corni fructus: Possible involvement of the PI3K–Akt/PKB signaling pathway. *RSC Advances*, 8(53), 30539–30549. https://doi.org/10.1039/C8RA06045B
104. Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 17016. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16
105. Kavishankar, G.B., Lakshmidevi, N., Murthy, S.M., Prakash, H.S., & Niranjana, S.R. (2011). Diabetes and medicinal plants-A review. *International Journal of Biomedical Science*, *2*(3), 65–80.
106. Kawasaki, E. (2014). Type 1 Diabetes and Autoimmunity. *Clinical Pediatric Endocrinology*, *23*(4), 99–105. https://doi.org/10.1297/cpe.23.99
107. Kazeem, M. I., Adamson, J. O., & Ogunwande, I. A. (2013). Modes of inhibition of α-amylase and α-glucosidase by aqueous extract of Morinda lucida Benth leaf. *BioMed Research International*, 2013, 527570. https://doi.org/10.1155/2013/527570
108. Kazeem, M., Akanji, M., Hafizur, R. M., & Choudhary, M. (2012). Antiglycation, antioxidant and toxicological potential of polyphenol extracts of alligator pepper, ginger and nutmeg from Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 727–732. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60218-4
109. Kerksick, C. M., & Zuhl, M. (2015). Mechanisms of oxidative damage and their impact on contracting muscle. in m. lamprecht (Ed.), *Antioxidants in Sport Nutrition*. CRC Press/Taylor & Francis. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299057/

110. Khan, R., Yee Ooi, X., Parvus, M., Valdez, L., & Tsin, A. (2020). Advanced glycation end products: formation, role in diabetic complications, and potential in clinical applications. In J. Grigsby & F. Derbel (Eds.), *The Eye and Foot in Diabetes*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.89408
111. Khan, V., Najmi, A. K., Akhtar, M., Aqil, M., Mujeeb, M., & Pillai, K. K. (2012). A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, *4*(1), 27. https://doi.org/10.4103/0975-7406.92727
112. Kharroubi, A. T. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, *6*(6), 850. https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850
113. Kim, S. Y., Johnson, M. A., McLeod, D. S., Alexander, T., Hansen, B. C., & Lutty, G. A. (2005). Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas. *Diabetes*, *54*(5), 1534–1542. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1534
114. Kim, Y.-M., Jeong, Y.-K., Wang, M.-H., Lee, W.-Y., & Rhee, H.-I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), *21*(6), 756–761. https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.10.014
115. Kipmen-Korgun, D., Bilmen-Sarikcioglu, S., Altunbas, H., Demir, R., & Korgun, E. T. (2009). Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *69*(3), 350–358. https://doi.org/10.1080/00365510802632163
116. Kitabchi, A. E., Umpierrez, G. E., Miles, J. M., & Fisher, J. N. (2009). Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care*, *32*(7), 1335–1343. https://doi.org/10.2337/dc09-9032
117. Klein, G., Kim, J., Himmeldirk, K., Cao, Y., & Chen, X. (2007). Antidiabetes and anti-obesity activity of lagerstroemia speciosa. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *4*(4), 401–407. https://doi.org/10.1093/ecam/nem013
118. Korgun, E. T., Demir, R., Sedlmayr, P., Desoye, G., Arikan, G. M., Puerstner, P., Haeusler, M., Dohr, G., Skofitsch, G., & Hahn, T. (2002). Sustained hypoglycemia

affects glucose transporter expression of human blood leukocytes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *28*(2), 152–159. https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0504

119. Krawisz, J. E., Sharon, P., & Stenson, W. F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, *87*(6), 1344–1350.
120. Kucharska, A. Z., Szumny, A., Sokół-Łętowska, A., Piórecki, N., & Klymenko, S. V. (2015). Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, *40*, 95–102. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.016
121. Kucharska, A., Sokół-Łętowska, A., Oszmiański, J., Piórecki, N., & Fecka, I. (2017). Iridoids, phenolic compounds and antioxidant activity of edible honeysuckle berries (Lonicera caerulea var. kamtschatica Sevast.). *Molecules*, *22*(3), 405. https://doi.org/10.3390/molecules22030405
122. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *TheScientificWorldJournal*, *2013*, 162750. https://doi.org/10.1155/2013/162750
123. Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). Inhibitory potential of wine and tea against α-amylase and α-glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of Food Biochemistry*, 32(1), 15–31. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00165.x
124. Lamprecht, M. (2014). *Antioxidants in Sport Nutrition*. Taylor & Francis. https://doi.org/10.1201/b17442
125. Lang, F., Singh, Y., Salker, M. S., Ma, K., Pandyra, A. A., Lang, P. A., & Lang, K. S. (2020). Glucose transport in lymphocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *472*(9), 1401–1406. https://doi.org/10.1007/s00424-020-02416-y
126. Lee, B.-W., Chae, H. Y., Kwon, S. J., Park, S. Y., Ihm, J., & Ihm, S.-H. (2010). RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic β-cells via oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*, *26*(6), 813–818.
127. Lee, T.-I., Kao, Y.-H., Chen, Y.-C., Huang, J.-H., Hsiao, F.-C., & Chen, Y.-J. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptors modulate cardiac dysfunction in diabetic

cardiomyopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *100*(3), 330–339. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.01.008

128. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry (5th ed). W.H. Freeman.
129. Leslie, R. D. G., Atkinson, M. A., & Notkins, A. L. (1999). Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, *42*(1), 3–14. https://doi.org/10.1007/s001250051105
130. Leslie, R. D. G., Beyan, H., Sawtell, P., Boehm, B. O., Spector, T. D., & Snieder, H. (2003). Level of an advanced glycated end product is genetically determined: a study of normal twins. *Diabetes*, *52*(9), 2441–2444. https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2441
131. Li, C., Miao, X., Li, F., Wang, S., Liu, Q., Wang, Y., & Sun, J. (2017). Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–15. https://doi.org/10.1155/2017/9702820
132. Lin, M.-H., Liu, H.-K., Huang, W.-J., Huang, C.-C., Wu, T.-H., & Hsu, F.-L. (2011). Evaluation of the potential hypoglycemic and beta-cell protective constituents isolated from corni fructus to tackle insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(14), 7743–7751. https://doi.org/10.1021/jf201189r
133. Lindsey, J. B., Cipollone, F., Abdullah, S. M., & McGuire, D. K. (2009). Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diabetes & Vascular Disease Research*, *6*(1), 7–14. https://doi.org/10.3132/dvdr.2009.002
134. Liou, S.S., Liu, I.M., Hsu, S.F., & Cheng, J.T. (2004). Corni fructus as the major herb of Die-Huang-Wan for lowering plasma glucose in Wistar rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *56*(11), 1443–1447. https://doi.org/10.1211/0022357044670
135. Liu, J., Guo, L., Yin, F., Zhang, Y., Liu, Z., & Wang, Y. (2013). Geniposide regulates glucose-stimulated insulin secretion possibly through controlling glucose metabolism

in INS-1 cells. *PLoS ONE*, *8*(10), e78315. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078315

136. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.
137. Lupak, M. I., Khokhla, M. R., Hachkova, G. Ya., Kanyuka, O. P., Klymyshyn, N. I., Chajka, Ya. P., Skybitska, N. I., & Sybirna, N. O. (2015). The alkaloid-free fraction from Galega officinalis extract prevents. *The Ukrainian Biochemical Journal*, *87*(4), 78–86. https://doi.org/10.15407/ubj87.04.078
138. Ma, W., Wang, K.-J., Cheng, C.-S., Yan, G., Lu, W.-L., Ge, J.-F., Cheng, Y.-X., & Li, N. (2014). Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy. *Journal of Ethnopharmacology*, *153*(3), 840–845. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.051
139. Maitra, S., & Dutta, D. (2020). Downregulation of hexose sugar metabolism in diabetes decreases the rate of wound healing. In *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes* (pp. 259–270). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816413-6.00013-7
140. Mallone, R., & Brezar, V. (2011). To B or Not to B: (Anti)bodies of Evidence on the Crime Scene of Type 1 Diabetes? *Diabetes*, *60*(8), 2020–2022. https://doi.org/10.2337/db11-0700
141. Maratou, E., Dimitriadis, G., Kollias, A., Boutati, E., Lambadiari, V., Mitrou, P., & Raptis, S. A. (2007). Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *European Journal of Clinical Investigation*, *37*(4), 282–290. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x
142. Maroo, J., Vasu, V. T., Aalinkeel, R., & Gupta, S. (2002). Glucose lowering effect of aqueous extract of Enicostemma littorale Blume in diabetes: a possible mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, *81*(3), 317–320. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00095-8
143. Marques, C. M. S., Nunes, E. A., Lago, L., Pedron, C. N., Manieri, T. M., Sato, R. H., Oliveira, V. X., & Cerchiaro, G. (2017). Generation of Advanced Glycation End-

Products (AGEs) by glycoxidation mediated by copper and ROS in a human serum albumin (HSA) model peptide: reaction mechanism and damage in motor neuron cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *824*, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.10.005

144. Masjedi, F., Gol, A., & Dabiri, S. (2013). Preventive effect of garlic (Allium sativum L.) on serum biochemical factors and histopathology of pancreas and liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *12*(3), 325–338.
145. Masuda, M., Murakami, T., Egawa, H., & Murata, K. (1990). Decreased fluidity of polymorphonuclear leukocyte membrane in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, *39*(4), 466–470. https://doi.org/10.2337/diab.39.4.466
146. Matsuda, H., Murakami, T., Yashiro, K., Yamahara, J., & Yoshikawa, M. (1999). Antidiabetic principles of natural medicines. IV. Aldose reductase and qlpha-glucosidase inhibitors from the roots of Salacia oblonga Wall. (Celastraceae): structure of a new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *47*(12), 1725–1729. https://doi.org/10.1248/cpb.47.1725
147. McCrimmon, R. J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M. C., Zhou, L., McNay, E. C., & Sherwin, R. S. (2008). Key Role for AMP-Activated Protein Kinase in the Ventromedial Hypothalamus in Regulating Counterregulatory Hormone Responses to Acute Hypoglycemia. *Diabetes*, *57*(2), 444–450. https://doi.org/10.2337/db07-0837
148. Musi, N., & Goodyear, L. J. (2002). Targeting the AMP-activated protein kinase for the treatment of type 2 diabetes. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, *2*(2), 119–127.
149. Nahdi, A. M. T. A., John, A., & Raza, H. (2017). Elucidation of molecular mechanisms of streptozotocin-induced oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in rin-5f pancreatic β-cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, e7054272. https://doi.org/10.1155/2017/7054272
150. Nespolo, M. (2017). Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition. By Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. Oxford University Press, 2015. Pp. xxxviii +

905. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, *73*(4), 384–385. https://doi.org/10.1107/S2059798317004533

151. Ning, Z., Zhai, L., Huang, T., Peng, J., Hu, D., Xiao, H., Wen, B., Lin, C., Zhao, L., & Bian, Z. (2019). Identification of α-glucosidase inhibitors from cyclocarya paliurus tea leaves using UF-UPLC-Q/TOF-MS/MS and molecular docking. *Food & Function*, *10*(4), 1893–1902. https://doi.org/10.1039/C8FO01845F
152. Obrosova, I. G. (2005). Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(11–12), 1543–1552. https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1543
153. Ogunwande, I. A., Matsui, T., Fujise, T., & Matsumoto, K. (2007). α-Glucosidase inhibitory profile of nigerian medicinal plants in immobilized assay system. *Food Science and Technology Research*, *13*(2), 169–172. https://doi.org/10.3136/fstr.13.169
154. Oliaee, D., Niazkar, H. R., Abbasnezhad, A., Ghorbani, M., Alavi Shahri, P. S., Saghaee Shahri, S., & Ghanaiyan, K. (2020). The effects of medicinal plants on pancreatic beta cells in diabetes: A Systematic Review of Iranians' Contributions. *Reviews in Clinical Medicine*, *7*(1). https://doi.org/10.22038/rcm.2020.45828.1303
155. Olivares-Vicente, M., Sánchez-Marzo, N., Encinar, J. A., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Arraez-Roman, D., Riva, C., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2019). The Potential synergistic modulation of AMPK by Lippia citriodora compounds as a target in metabolic disorders. *Nutrients*, *11*(12), 2961. https://doi.org/10.3390/nu11122961
156. Oliveira, M. I. A., Souza, E. M. de, Pedrosa, F. de O., Réa, R. R., Alves, A. da S. C., Picheth, G., & Rego, F. G. de M. (2013). RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *49*, 97–108. https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000200004
157. Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, *2*, 411–429. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016

158. Oyagbemi, A. A., Salihu, M., Oguntibeju, O. O., Esterhuyse, A. J., & O. Farombi, E. (2014). Some selected medicinal plants with antidiabetic potentials. In O. Oguntibeju (Ed.), *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*. InTech. https://doi.org/10.5772/57230

159. Oyedemi, S. O., Nwaogu, G., Chukwuma, C. I., Adeyemi, O. T., Matsabisa, M. G., Swain, S. S., & Aiyegoro, O. A. (2020). Quercetin modulates hyperglycemia by improving the pancreatic antioxidant status and enzymes activities linked with glucose metabolism in type 2 diabetes model of rats: In silico studies of molecular interaction of quercetin with hexokinase and catalase. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(2). https://doi.org/10.1111/jfbc.13127

160. Palmer, C. S., Anzinger, J. J., Butterfield, T. R., McCune, J. M., & Crowe, S. M. (2016). A simple flow cytometric method to measure glucose uptake and glucose transporter expression for monocyte subpopulations in whole blood. *Journal of Visualized Experiments*, *114*, 54255. https://doi.org/10.3791/54255

161. Panahi, F., Yousefi, R., Mehraban, M. H., & Khalafi-Nezhad, A. (2013). Synthesis of new pyrimidine-fused derivatives as potent and selective antidiabetic α-glucosidase inhibitors. *Carbohydrate Research*, *380*, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.07.008

162. Panahi, G., Pasalar, P., Zare, M., Rizzuto, R., & Meshkani, R. (2018). High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress-mediated activation of NF-κB, and MAPK pathways in HepG2 cells. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *124*(5), 468–474. https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1427764

163. Park, C. H., Noh, J. S., Tanaka, T., Uebaba, K., Cho, E. J., & Yokozawa, T. (2011). The effects of corni fructus extract and its fractions against α-glucosidase inhibitory activities *in vitro* and sucrose tolerance in normal rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, *39*(02), 367–380. https://doi.org/10.1142/S0192415X11008889

164. Park, C. H., Tanaka, T., Kim, J. H., Cho, E. J., Park, J. C., Shibahara, N., & Yokozawa, T. (2011). Hepato-protective effects of loganin, iridoid glycoside from Corni Fructus, against hyperglycemia-activated signaling pathway in liver of type 2

diabetic db/db mice. *Toxicology*, *290*(1), 14–21. https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.08.004

165. Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine Connections*, *7*(1), R38–R46. https://doi.org/10.1530/EC-17-0347
166. Pathmanathan, S., & Somasundaram, N. P. (2014). HbA1C and diabetes – an overview. *Sri Lanka Journal of Diabetes Endocrinology and Metabolism*, 3(2), 104. https://doi.org/10.4038/sjdem.v3i2.6379
167. Pawlowska, A. M., Camangi, F., & Braca, A. (2010). Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (Cornaceae) fruits. *Food Chemistry*, *119*(3), 1257–1261. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.063
168. Peng, X., Zhang, G., Liao, Y., & Gong, D. (2016). Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α-glucosidase. *Food Chemistry*, *190*, 207–215. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.088
169. Perrone, A., Giovino, A., Benny, J., & Martinelli, F. (2020). Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, e3818196. https://doi.org/10.1155/2020/3818196
170. Piątkiewicz, P., Czech, A., & Tatoń, J. (2007). Glucose transport in human peripheral blood lymphocytes influenced by type 2 diabetes mellitus. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *55*(2), 119–126. https://doi.org/10.1007/s00005-007-0015-9
171. Pociot, F., & McDermott, M. F. (2002). Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes & Immunity*, *3*(5), 235–249. https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363875
172. Pournaghi, P., Sadrkhanlou, R.-A., Hasanzadeh, S., & Foroughi, A. (2012). An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, *3*(2), 79–84.
173. Powers, S. K., Duarte, J., Kavazis, A. N., & Talbert, E. E. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation: Redox signalling and

skeletal muscle. *Experimental Physiology*, *95*(1), 1–9. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.050526

174. Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017). α-Glucosidase inhibition by flavonoids: An in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *32*(1), 1216–1228. https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368503
175. Punthakee, Z., Goldenberg, R., & Katz, P. (2018). Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*, *42*, S10–S15. https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.003
176. Purintrapiban, J., Suttajit, M., & Forsberg, N. E. (2006). Differential activation of glucose transport in cultured muscle cells by polyphenolic compounds from Canna indica L. Root. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *29*(10), 1995–1998. https://doi.org/10.1248/bpb.29.1995
177. Qian, F., Guo, X., Wang, X., Yuan, X., Chen, S., Malawista, S. E., Bockenstedt, L. K., Allore, H. G., & Montgomery, R. R. (2014). Reduced bioenergetics and toll-like receptor 1 function in human polymorphonuclear leukocytes in aging. *Aging*, *6*(2), 131–139. https://doi.org/10.18632/aging.100642
178. Qin, J., Goswami, R., Dawson, S., & Dawson, G. (2008). Expression of the receptor for advanced glycation end products in oligodendrocytes in response to oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(11), 2414–2422. https://doi.org/10.1002/jnr.21692
179. Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S. M.-B., Adibi, H., & Khodarahmi, R. (2017). Differential α-amylase/α-glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: A virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & Function*, *8*(5), 1942–1954. https://doi.org/10.1039/c7fo00220c
180. Raucci, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S. M., Monti, L., Bierhaus, A., Reiss, K., Saftig, P., & Bianchi, M. E. (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10

(ADAM10). *The FASEB Journal*, *22*(10), 3716–3727. https://doi.org/10.1096/fj.08-109033

181. Rizvi, S. I., & Zaid, M. A. (2001). Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: Effect of insulin and (-)epicatechin. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *52*(3), 483–488.
182. Rösen, P., Nawroth, P. P., King, G., Möller, W., Tritschler, H.-J., & Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: asummary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *17*(3), 189–212. https://doi.org/10.1002/dmrr.196
183. Różańska, D., & Regulska-Ilow, B. (2018). The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *27*(1), 135–142. https://doi.org/10.17219/acem/64983
184. Rungratanawanich, W., Qu, Y., Wang, X., Essa, M. M., & Song, B.J. (2021). Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. *Experimental & Molecular Medicine*, *53*(2), 168–188. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00561-7
185. Samad, M. B., Mohsin, M. N. A. B., Razu, B. A., Hossain, M. T., Mahzabeen, S., Unnoor, N., Muna, I. A., Akhter, F., Kabir, A. U., & Hannan, J. M. A. (2017). [6]-Gingerol, from Zingiber officinale, potentiates GLP-1 mediated glucose-stimulated insulin secretion pathway in pancreatic β-cells and increases RAB8/RAB10-regulated membrane presentation of GLUT4 transporters in skeletal muscle to improve hyperglycemia in Leprdb/db type 2 diabetic mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 395. https://doi.org/10.1186/s12906-017-1903-0
186. Sannomiya, P., Oliveira, M. A., & Fortes, Z. B. (1997). Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. *British Journal of Pharmacology*, *122*(5), 894–898. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701448

187. Sato, N., Shimizu, H., Suwa, K., Shimomura, Y., Kobayashi, I., & Mori, M. (1992). MPO activity and generation of active O_2 species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Care*, *15*(8), 1050–1052. https://doi.org/10.2337/diacare.15.8.1050
188. Saxena, R., & Batra, J. (2020). Arthritis as a disease of aging and changes in antioxidant status. In *Aging* (pp. 83–94). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818698-5.00008-0
189. Seniv, M. B., Dzydzan, O. V., Brodyak, I. V., Kucharska, A. Z., & Sybirna, N. O. (2021). Antioxidant effect of extract of yellow fruits of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in rats' leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Studia Biologica*, *15*(1), 15–26. https://doi.org/10.30970/sbi.1501.645
190. Shanak, S., Saad, B., & Zaid, H. (2019). Metabolic and epigenetic action mechanisms of antidiabetic medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2019*, e3583067. https://doi.org/10.1155/2019/3583067
191. Sheela, C. G., Kumud, K., & Augusti, K. T. (1995). Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Medica*, *61*(4), 356–357. https://doi.org/10.1055/s-2006-958099
192. Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, *18*(1), 1. https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1
193. Škrha Jr, J., Kalousová, M., Švarcová, J., Muravská, A., Kvasnička, J., Landová, L., Zima, T., & Škrha, J. (2012). Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *120*(05), 277–281. https://doi.org/10.1055/s-0031-1283161
194. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, e6175804. https://doi.org/10.1155/2019/6175804

195. Song, Q., Liu, J., Dong, L., Wang, X., & Zhang, X. (2021). Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *140*, 111750. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111750
196. Souza, A., Mbatchi, B., & Herchuelz, A. (2011). Induction of insulin secretion by an aqueous extract of Tabernanhte iboga Baill. (Apocynaceae) in rat pancreatic islets of Langerhans. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(3), 1015–1020. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.028
197. Sozański, T., Kucharska, A. Z., Rapak, A., Szumny, D., Trocha, M., Merwid-Ląd, A., Dzimira, S., Piasecki, T., Piórecki, N., Magdalan, J., & Szeląg, A. (2016). Iridoid-loganic acid versus anthocyanins from the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry): Common and different effects on diet-induced atherosclerosis, PPARs expression and inflammation. *Atherosclerosis*, *254*, 151–160. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.001
198. Sozański, T., Kucharska, A. Z., Szumny, D., Magdalan, J., Merwid-Ląd, A., Nowak, B., Piórecki, N., Dzimira, S., Jodkowska, A., Szeląg, A., & Trocha, M. (2017). Cornelian cherry consumption increases the L-arginine/ADMA ratio, lowers ADMA and SDMA levels in the plasma, and enhances the aorta glutathione level in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, *34*, 189–196. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.028
199. Stephens, J. M., Lee, J., & Pilch, P. F. (1997). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(2), 971–976. https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.971
200. Strugała, P., Cyboran-Mikołajczyk, S., Dudra, A., Mizgier, P., Kucharska, A. Z., Olejniczak, T., & Gabrielska, J. (2016). Biological activity of Japanese Quince Extract and its interactions with lipids, erythrocyte membrane, and human albumin. *The Journal of Membrane Biology*, *249*(3), 393–410. https://doi.org/10.1007/s00232-016-9877-2

201. Strugała, P., Dudra, A., & Gabrielska, J. (2016). Interaction between mimic lipid membranes and acylated and nonacylated cyanidin and its bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(39), 7414–7422. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03066
202. Sugamura, K., & Keaney, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(5), 978–992. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004
203. Suzuki, Y. J., Carini, M., & Butterfield, D. A. (2010). Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *12*(3), 323–325. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887
204. Szabó, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters*, *140–141*, 105–112. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00507-6
205. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, *50*(6), 537–546.
206. Szopa, T. M., Titchener, P. A., Portwood, N. D., & Taylor, K. W. (1993). Diabetes mellitus due to viruses some recent developments. *Diabetologia*, *36*(8), 687–695. https://doi.org/10.1007/BF00401138
207. Trinder, P. (1969). Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *Journal of Clinical Pathology*, *22*(2), 246–246. https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.246-b
208. Ukhin A., Izhytskyi V., Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Hypoglycemic effect of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts under streptozotocin induced diabetes mellitus in rats [Poster presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 81–82.
209. Unubol, M., Yavasoglu, I., Kacar, F., Guney, E., Omurlu, I. K., Ture, M., Kadikoylu, G., & Bolaman, Z. (2015). Relationship between glycemic control and histochemical myeloperoxidase activity in neutrophils in patients with type 2 diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *7*(1), 119. https://doi.org/10.1186/s13098-015-0115-3

210. Valerius, N. H., Eff, C., Hansen, N. E., Karle, H., Nerup, J., Søeberg, B., & Sørensen, S. F. (1982). Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. *Acta Medica Scandinavica*, *211*(6), 463–467. https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1982.tb01983.x

211. van Kampen, E. J., & Zijlstra, W. G. (1983). Spectrophotometry of Hemoglobin and Hemoglobin Derivatives. In Advances in Clinical Chemistry (Vol. 23, pp. 199–257). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60401-1

212. Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., Yu, L., Pietropaolo, M., Chase, H. P., Eisenbarth, G. S., & Jackson, R. A. (1996). Prediction of type i diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, *45*(7), 926–933. https://doi.org/10.2337/diab.45.7.926

213. Wang, M., Jiang, J., Tian, J., Chen, S., Ye, X., Hu, Y., & Chen, J. (2019). Inhibitory mechanism of novel allosteric inhibitor, Chinese bayberry (Myrica rubra Sieb. Et Zucc.) leaves proanthocyanidins against α-glucosidase. *Journal of Functional Foods*, *56*, 286–294. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.026

214. Wautier, M.-P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., & Wautier, J.-L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *280*(5), E685–E694. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E685

215. West, B. J., Uwaya, A., Isami, F., Deng, S., Nakajima, S., & Jensen, C. J. (2014). Antiglycation activity of iridoids and their food sources. *International Journal of Food Science*, 2014, 1–8. https://doi.org/10.1155/2014/276950

216. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, *49*(5), 1304–1313. https://doi.org/10.1038/ki.1996.186

217. Wu, C.-H., Huang, S.-M., Lin, J.-A., & Yen, G.-C. (2011). Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food & Function*, *2*(5), 224–234. https://doi.org/10.1039/C1FO10026B

218. Xu, H.-Q., & Hao, H.-P. (2004). Effects of iridoid total glycoside from *Cornus officinalis* on prevention of glomerular overexpression of transforming growth factor beta 1 and matrixes in an experimental diabetes model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *27*(7), 1014–1018. https://doi.org/10.1248/bpb.27.1014

219. Yamabe, N., Kang, K. S., Matsuo, Y., Tanaka, T., & Yokozawa, T. (2007). Identification of antidiabetic effect of iridoid glycosides and low molecular weight polyphenol fractions of corni fructus, a constituent of Hachimi-jio-gan, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *30*(7), 1289–1296. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1289

220. Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429. https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998

221. Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, e8609213. https://doi.org/10.1155/2020/8609213

222. Yeh, S. T. (2002). Using trapezoidal rule for the area under a curve calculation. Proceedings of the Twenty-Seventh Annual SAS® User Group International (SUGI) Conference, 27, 229–237.

223. Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014). α-Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, *3*(3–4), 136–174. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003

224. Yong, Y., Shin, S. Y., Jung, Y., Jung, H., Ahn, S., Chong, Y., & Lim, Y. (2015). Flavonoids activating adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *58*(1), 13–19. https://doi.org/10.1007/s13765-015-0003-4

225. Yoon, J.-W., & Jun, H.-S. (2005). Autoimmune Destruction of Pancreatic β Cells. *American Journal of Therapeutics*, *12*(6), 580–591. https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000178767.67857.63

226. Yu, B., Zhang, G., An, Y., & Wang, W. (2018). Morroniside on anti-inflammation activities in rats following acute myocardial infarction. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, *22*(1), 17. https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.1.17
227. Zahan, R., Ripa, F. A., Alam, M. B., Haque, M. A., Mosaddik, M. A., & Nahar, L. (2011). Hypoglycemic and *in vitro* antioxidant effects of methanolic extract of Marsilea quadrifolia plant. *Pharmacognosy Journal*, *3*(26), 86–92. https://doi.org/10.5530/pj.2011.26.14
228. Zang, Y., Zhang, L., Igarashi, K., & Yu, C. (2015). The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food & Function*, 6(3), 834–841. https://doi.org/10.1039/C4FO00844H
229. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–18. https://doi.org/10.1155/2016/4350965
230. Zhang, L., Bukulin, M., Kojro, E., Roth, A., Metz, V.V., Fahrenholz, F., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., & Postina, R. (2008). Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(51), 35507–35516. https://doi.org/10.1074/jbc.M806948200
231. Zhang, Y., & Liu, D. (2011). Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *European Journal of Pharmacology*, *670*(1), 325–332. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.011
232. Zhu, J., Chen, C., Zhang, B., & Huang, Q. (2020). The inhibitory effects of flavonoids on α-amylase and α-glucosidase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(4), 695–708. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1548428
233. Zhu, Y., Shu, T., Lin, Y., Wang, H., Yang, J., Shi, Y., & Han, X. (2011). Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic β-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *404*(1), 159–165. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.085

234. Беркало, Л. В., Бобович, О. В., & Боброва, Н. О. (2003). Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. *Полімет,* 320.

235. Боярська, З. (2019). Антиглікаційні стратегії профілактики старіння. *Український Журнал Медицини, Біології Та Спорту*, *4*(6), 309–315. https://doi.org/10.26693/jmbs04.06.309

236. Дзидзан О., Бродяк І., Кухарська А., Сибірна Н. (2019, 30 вересня – 4 жовтня). Антиоксидантний ефект екстрактів з плодів дерену справжнього (*Cornus mas* L.) і логанової кислоти у плазмі крові щурів за стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету [Тези]. XII Українському біохімічному конгресі, присвяченому 165-й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна, 87–88.

237. Королюк, М. А., Иванова, И. Г., & Майорова, И. Г. (1988). Метод определения активности каталазы. *Лабораторное Дело*, *1*, 16–18.

238. Кузнєцова, М. Ю., Конечна, Р. Т., Галенова, Т. І., Новіков, В. П., & Савчук, О. М. (2016). Антидіабетичні властивості лікарських рослин, поширених на території України. *Український Біофармацевтичний Журнал*, *2*, 40–44. http://nbuv.gov.ua/UJRN/ubfj_2016_2_10

239. Лаповець, Л. Є., & Луцик, Б. Д. (2002). Посібник з лабораторної імунології. Видавництво Тараса Сороки, 173.

240. Мерецький, В. М. (2006). *Фітотерапевтичні аспекти лікування цукрового діабету*. *1*, 6–10.

241. Моин, В. М. (1986). Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное Дело*, *12*, 124–126.

242. Мороз А. Сенів М., Дзидзан О., Бродяк І., Сибірна Н. (2020, 25 березня). Зміни в лейкоцитарній формулі крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом за введення логанової кислоти та екстрактів з червоних і жовтих плодів дерену справжнього (*Cornus mas L.*). Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених: Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур, ДСЛР ІАП НААН, Лубни, Україна, 228–232.

243. Рулева, Н. Ю., Звягинцева, М. А., & Дугин, С. Ф. (2007). Миелопероксидаза: Биологические функции и клиническое значение. *Современные Наукоемкие Технологии*, *8*, 11–14.

244. Сибірна, Н. О., Барська, М. Л., & Грищук, І. (2004). Морфофункціональна характеристика імунокомпетентних клітин крові за умов цукрового діабету 1 типу. *Вісник Львів. УН-ТУ*, *35*, 77–83.

245. Сибірна, Н. О., Бурда, В. А., & Чайка, Я. П. (2006). Методи дослідження систем крові : навчально-методичний посібник. *Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка*.

246. Скибчик, В. А., & Соломенчук, Т. М. (2005). Глікозильований гемоглобін – фактор підвищеного ризику мікро- і макросудинних ускладнень у хворих на цукровий діабет. *Український Медичний Часопис*, *5*, 81–88.

247. Старкова, Н. Т. (2002). *Клиническая эндокринология: руководство* (3-е изд.). Питер.

248. Тимирбулатов, Р. А., & Селезнев, Е. И. (1981). Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. *Лабораторное Дело*, *4*, 209–211.

249. Хухліна, О. С. (2007). *Роль інсулінорезистентності у патогенезі неалкогольної жирової хвороби печінки, Частина II*. *4*(36), 81–86.

250. Чевари, С., Андял, Т., & Штиренгер, Д. (1991). Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте. *Лабораторное Дело*, *10*, 9–13.

251. Чекман, І. С., Дацюк, Н. О., Лук'янова, О. М., & Загородній, М. І. (2008). Роль перекисного окислення ліпідів у патогенезі артеріальної гіпертензії. *Ліки України*, *6*, 76–81.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Dzydzan, O., Bila, I., Kucharska, A. Z., Brodyak, I., & Sybirna, N. (2019). Antidiabetic effects of extracts of red and yellow fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Food & Function*, *10*(10), 6459–6472. https://doi.org/10.1039/C9FO00515C (Q1)
2. Dzydzan, O., Brodyak, I., Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A. Z., & Sybirna, N. (2020). Loganic acid, an iridoid glycoside extracted from *Cornus mas* L. fruits, reduces of carbonyl/oxidative stress biomarkers in plasma and restores antioxidant balance in leukocytes of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life*, *10*(12), 349. https://doi.org/10.3390/life10120349 (Q2)
3. Seniv, M. B., Dzydzan, O. V., Brodyak, I. V., Kucharska, A. Z., & Sybirna, N. O. (2021). Antioxidant effect of extract of yellow fruits of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in rats' leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus. Studia Biologica, *15*(1), 15–26. https://doi.org/10.30970/sbi.1501.645

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Dzydzan O., Bila I., Babiy D., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Changes of blood system's indicators in the experimental diabetes mellitus under *per os* administration of extracts from cornelian cherry (*Cornus mas* L.) [Oral presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology", dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 58.
2. Brezvin Y., Bila I., Dzydzan O., Gordeichuk A., Kucharska A. Z., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Effect of loganic acid on some indicators of blood system under experimental diabetes mellitus [Oral presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of

biology”, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 57.

3. Ukhin A., Izhytskyi V., Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 10–12). Hypoglycemic effect of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts under streptozotocin induced diabetes mellitus in rats [Poster presentation]. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, Ukraine, 81–82.
4. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, April 16–20). Infuence of *Cornus mas* L. extracts and loganic acid on blood erythrocytes under experimental diabetes mellitus [Poster presentation]. Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 253.
5. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2018, June 20–21). Effect of extract from red fruits of *Cornus mas* L. on the state of antioxidant defence system in leukocytes under experimental diabetes mellitus [Abstracts]. Eighth International Conference on “Quality and safety in food production chain”, Wrocław, Poland, 32–33.
6. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2019, April 9–11). Effect of extract from yellow fruits of *Cornus mas* L. on the markers of antioxidant system in rats’ blood leukocytes under conditions of streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XV International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas, Lviv, Ukraine, 40.
7. Dzydzan O., Bila I., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2019, May 20–24). The Effect of the Iridoid – Loganic Acid from the *Cornus mas* L. fruits on plasma markers of oxidation stress in streptozotocin-induced diabetic rats [Oral presentation]. Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, 358.
8. Дзидзан О., Бродяк І., Кухарська А., Сибірна Н. (2019, 30 вересня – 4 жовтня). Антиоксидантний ефект екстрактів з плодів дерену справжнього

(*Cornus mas* L.) і логанової кислоти у плазмі крові щурів за стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету [Тези]. XII Український біохімічний конгрес, присвяченому 165-й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна, 87–88.

9. Мороз А. Сенів М., Дзидзан О., Бродяк І., Сибірна Н. (2020, 25 березня). Зміни в лейкоцитарній формулі крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом за введення логанової кислоти та екстрактів з червоних і жовтих плодів дерену справжнього (*Cornus mas L.*) [Заочна участь]. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених: Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур, ДСЛР ІАП НААН, Лубни, Україна, 228–232.
10. Alfavitskyi O., Dzydzan O., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, April 27–29). Effect of extracts obtained from the *Cornus mas* L. fruits on the level of reactive oxygen species and oxidatively modified proteins in leukocytes under conditions of streptozotocin-induced diabetes [Oral presentation]. XVI International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 75th anniversary of the Faculty of Biology of Ivan Franko National University of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M. P. Derkach, Lviv, Ukraine, 40.
11. Kalanova S., Seniv M., Moroz A., Dzydzan O., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, April 27–29). Effect of extract of red fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on the activity of antioxidant defence enzymes in rat’s red blood cells with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XVI International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology”, dedicated to the 75th anniversary of the Faculty of Biology of Ivan Franko National University of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M. P. Derkach, Lviv, Ukraine, 42.
12. Dzydzan O. Moroz A., Seniv M., Kucharska A., Brodyak I., Sybirna N. (2020, October 1–2). Effect of iridoids and anthocyanins from the *Cornus mas* L. fruits on the antioxidant defense system in leukocytes under experimental diabetes mellitus.

[Abstract]. Fifth International scientific Conference “Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology”, Dnipro, Ukraine, 95–96.

13. Dzydzan O., Chaban M., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). Glucose transport and ATP content in leukocytes under administration of *Cornus mas* L. fruit extracts to animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, Lviv, Ukraine, 55–56.
14. Dzydzan O., Kuchurka O., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). The extracts of *Cornus mas* L. fruits prevent the development of carbonyl stress in blood plasma of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus [Oral presentation]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, Lviv, Ukraine, 57.
15. Dzydzan O. Kalanova S., Brodyak I., Kucharska A. Z., Sybirna N. (2021, April 19–21). An *in vitro* evaluation of hypoglycaemic potential of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits’ extracts [Abstract]. XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”, Lviv, Ukraine, 56.