

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

КУЗНЄЦОВА МАР'ЯНА ЮРІЇВНА

УДК: 615.322: 616.379-008.64

**«МЕТАБОЛІЧНІ РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ ЗА ДІЇ ЕКСТРАКТУ
ЛУШПИННЯ КВАСОЛІ ЗВИЧАЙНОЇ (*PHASEOLUS VULGARIS*) В
УМОВАХ РОЗВИТКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ»**

03.00.04-біохімія

Дисертація

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Савчук Олексій Миколайович

Київ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. Патогенез розвитку цукрового діабету	13
1.1. Патогенез ушкодження панкреатичних β -клітин за умов цукрового діабету	13
1.2. Патогенез інсулінорезистентності за умов цукрового діабету	20
РОЗДІЛ 2. Фітозасоби у лікуванні цукрового діабету	27
2.1. Фітозасоби, які виявляють свою антидіабетичну дію шляхом нормалізації вторинних ускладнень цукрового діабету	28
2.2. Фітозасоби, які виявляють пряму антидіабетичну дію	30
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи дослідження	41
3.1. Реактиви та матеріали	41
3.2. Обладнання	42
3.3. Одержання водних екстрактів чорниці звичайної, суниці лісової, кропиви дводомної, квасолі звичайної, розторопші плямистої та часнику посівного	43
3.4. Одержання сухого екстракту квасолі звичайної	43
3.5. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин	44
3.6. Умови проведення досліджень на щурах	44
3.7. Визначення толерантності до глюкози	45
3.8. Визначення концентрації глюкози в крові щурів	45
3.9. Визначення токсичності екстракту квасолі звичайної	45
3.10. Умови відтворення моделі цукрового діабету 1 типу	46
3.11. Умови проведення експерименту для дослідження впливу екстракту квасолі звичайної	47

3.12. Отримання сироватки крові щурів	47
3.13. Визначення біохімічних показників сироватки крові щурів	48
3.14. Визначення цитокінового профілю, вмісту інсуліну та імуноглобулінів класу G у сироватці крові щурів	48
3.15. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну у крові щурів	49
3.16. Визначення засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою щурів .	51
3.17. Отримання гомогенатів нирок, печінки та м'язової тканини.....	52
3.18. Отримання грубої мембранної фракції клітин м'язової тканини.....	53
3.19. Визначення вмісту глюкозного транспортера ГЛЮТ-4 та інсулінового рецептора у м'язовій тканині щурів	53
3.20. Визначення загальної тирозинпротеїназної активності у м'язовій тканині щурів.....	54
3.21. Визначення гексокіназної активності у печінці та м'язовій тканині щурів.....	55
3.22. Визначення глікогенсинтазної активності у печінці та м'язовій тканині щурів.....	56
3.23. Визначення вмісту малонового диальдегіду у печінці та нирках щурів.....	57
3.24. Визначення вмісту шифових основ та дієнових кон'югатів у печінці та нирках щурів	58
3.25. Визначення супероксиддисмутазної активності у печінці та нирках щурів.....	59
3.26. Визначення каталазної активності у печінці та нирках щурів	60
3.27. Визначення глутатіонпероксидазної активності у печінці та нирках щурів.....	61

3.28. Визначення глутатіон-S-трансферазної активності у печінці та нирках щурів.....	62
3.29. Визначення глутатіонредуктазної активності у печінці та нирках щурів.....	63
3.30. Хроматографічне розділення екстракту квасолі звичайної.....	64
3.31. Визначення концентрації білка	64
3.32. Статистична обробка отриманих результатів	65
РОЗДІЛ 4. Результати та їх обговорення.....	66
4.1. Гіпоглікемічні властивості деяких лікарських рослин, поширених на території України, що використовуються в народній медицині для лікування цукрового діабету	66
4.2. Гіпоглікемічні властивості екстракту <i>P. vulgaris</i> за умов експериментального цукрового діабету 1 типу у щурів	77
4.3. Антидіабетичні властивості екстракту <i>P. vulgaris</i> за умов його довготривалого введення.....	82
4.3.1. Показники вуглеводного обміну у щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту <i>P.vulgaris</i>	83
4.3.2. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту у печінці та нирках щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту <i>P. vulgaris</i>	93
4.3.3. Рівень цитокінів та імуноглобулінів класу G у сироватці крові щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту <i>P.vulgaris</i>	104
4.3.4. Інсулінозалежні процеси внутрішньоклітинного метаболізму глюкози у печінці та м'язовій тканині щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту <i>P. vulgaris</i>	108

4.4. Дія екстракту <i>P. vulgaris</i> на засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою та тирозинпротеїнкіназну активність <i>in vitro</i>	119
4.5. Хроматографічне розділення екстракту <i>P. vulgaris</i> та дослідження антигіперглікемічних властивостей його окремих фракцій	122
ЗАКЛЮЧЕННЯ	125
ВИСНОВКИ	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	134

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЛТ	– аланінамінотрансфераза
АСТ	– аспартатамінотрансфераза
АОЗ	– антиоксидантний захист
АФК	– активні форми кисню
ВЖК	– вільні жирні кислоти
ГГТ	– гама-глутамілтрансфераза
ГК	– гексокіназа
ГС	– глікогенсинтаза
ГП	– глутатіонпероксидаза
ГР	– глутатіонредуктаза
ГТ	– глутатіонтрансфераза
ДК	– дієнові кон'югати
ІР	– інсуліновий рецептор
ЛПВЩ	– ліпопротеїди високої щільності
ЛПНЩ	– ліпопротеїди низької щільності
МДА	– малоновий діальдегід
ПОЛ	– перокисне окиснення ліпідів
СОД	– супероксиддисмутаза
СТЗ	– стрептозотоцин
ТПК-аза	– тирозинова протеїнкіназа
ЦД	– цукровий діабет
ШО	– шиффові основи

AMPK	– AMP activated protein kinase (АМФ-активована протеїнкіназа)
Akt/PKB	– Akt/protein kinase B (кіназа із серин-треоніною специфічністю)
nPKC	– novel protein kinase C (нова серин-треонінова протеїнкіназа C)
GLUT	– glucose transporter (родина білків транспортерів глюкози)
IgG	– immunoglobulin G (імуноглобуліни класу G)
IFN- γ	– interferon- γ (інтерферон- γ)
IL	– interleukin (інтерлейкін)
IRS 1-4	– insulin receptor substrate proteins (білки субстрати інсулінового рецептора)
OPD	– <i>o</i> -фенілендіамін
PDK1	– 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (3-фосфоінозитидзалежна протеїнкіназа 1)
PEPCK	– phosphoenolpyruvate carboxykinase (фосфоенолпіруваткарбоксихіназа)
PI3-кіназа	– phosphatidylinositol 3-kinase (фосфатадилінозитол-3-кіназа)
TNF- α	– tumor necrosis factor- α (фактор некрозу пухлин - α)

ВСТУП

Актуальність теми. Цукровий діабет (ЦД) – це ендокринна патологія, яка утримує стабільну першість серед захворювань, пов'язаних з порушенням обміну речовин. Згідно з оцінкою експертів ВООЗ кількість хворих на ЦД у 2014 році сягнула 422 мільйонів [1]. Понад 1 мільйон хворих на це захворювання сьогодні зареєстровано в Україні і їх кількість постійно зростає [2]. Пошук нових підходів у лікуванні ЦД становить актуальну проблему медицини, що вказує на недостатню ефективність сучасних схем лікування [1]. Саме тому на сьогоднішній день одним з напрямків біохімії ЦД є дослідження антидіабетичних властивостей екстрактів рослин, що обумовлено мультифакторним характером їх терапевтичного впливу на перебіг ЦД, а також, на відміну від синтетичних лікарських препаратів та практично відсутніми небажаними токсичними ефектами [3].

До перспективних джерел розробки антидіабетичних лікарських засобів належить квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris*), відома у народній медицині як ефективний гіпоглікемічний засіб. Показано гіпоглікемічну ефективність екстрактів листя та бобів квасолі [3, 4]. Встановлено, що боби квасолі містять інгібітори α -амілазної та глюкозидазної активності, які уповільнюють засвоєння вуглеводів у шлунково-кишковому тракті [5]. Виявлено, що екстракти бобів *P. vulgaris* мають протекторний ефект по відношенню до інсулінопродукуючих β -клітин за умов ЦД [4]. Встановлено, що екстракти листя *P. vulgaris* окрім вираженої гіпоглікемічної дії позитивно впливають на функціональний стан печінки при ЦД [6]. Вітчизняними дослідниками показано гіпоглікемічні властивості екстракту наземної частини *P. vulgaris*, позитивний вплив екстракту на про/антиоксидантний баланс та вуглеводний обмін у печінці за умов ЦД [7, 8].

До найбільш популярних народних засобів лікування ЦД серед населення України належить відвар лушпиння бобів *P. vulgaris*. Однак,

антидіабетична дія цієї рослинної сировини залишається мало вивченою. У науковій літературі зустрічаються поодинокі дослідження гіпоглікемічних властивостей екстрактів лушпиння квасолі, зокрема щодо протекторного впливу на стан печінки при ЦД [9]. Однак комплексні дослідження щодо поліфункціонального впливу екстрактів лушпиння *P. vulgaris* за умов ЦД відсутні. Більш того, лишаються мало вивченими механізми його впливу на периферичні інсулінозалежні глюкозоутілізуючі тканини, зокрема, скелетні м'язи, що засвоюють 85% глюкози у відповідь на стимуляцію інсуліном [10].

Тому проведення подібного дослідження може мати вагоме значення для розробки нових лікарських засобів на основі екстракту лушпиння *P. vulgaris*. Цим й зумовлена практична значимість роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2016 рр., № д/р 0111U004648).

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи було проаналізувати метаболічні реакції організму за дії екстракту лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) на моделі цукрового діабету 1 типу.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Порівняти антигіперглікемічну дію екстрактів рослин, поширених на території України, які найчастіше використовуються при терапії ЦД 1 типу та вибрати найефективнішу фітосировину.
2. Дослідити основні показники вуглеводного обміну у щурів з моделлю ЦД 1 типу на фоні введення екстракту лушпиння *P. vulgaris*.
3. Вивчити показники інсулін-залежної ланки метаболізму глюкози у печінці та м'язовій тканині щурів з моделлю ЦД 1 типу на фоні введення екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

4. Визначити вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту у печінці та нирках щурів з моделлю ЦД 1 типу на фоні введення екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

5. Дослідити вміст про- та протизапальних цитокінів та імуноглобулінів класу G у щурів з моделлю ЦД 1 типу на фоні введення екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми дії екстракту лушпиння *P. vulgaris* за умов розвитку експериментального ЦД 1 типу.

Предмет дослідження: окремі показники вуглеводного обміну, прооксидантно-антиоксидантної системи та імунологічного статусу у щурів за умов експериментального ЦД 1 типу на фоні введення екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

Методи дослідження: центрифугування (ізолювання клітинних фракцій та очищення сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris*), спектрофотометричні (визначення активності ферментів та вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів), імуноферментний аналіз (визначення вмісту інсуліну, інсулінового рецептору, глюкозного транспортеру GLUT-4, цитокінів, імуноглобулінів класу G та тирозинкіназної активності), хроматографія (фракціонування сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris*) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено механізми антидіабетичної дії екстракту лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) у щурів за ЦД 1 типу. Встановлено, що довготривале введення цього екстракту підвищує толерантність тканин до глюкози, а також призводить до зниження концентрації глюкози, глікозильованого гемоглобіну у крові щурів з ЦД 1 типу. Отримані результати свідчать, що гіпоглікемічна дія екстракту не пов'язана зі зростанням концентрації інсуліну у крові щурів за даних умов. Вперше показано, що за умов введення екстракту лушпиння *P. vulgaris* щурам за ЦД 1 типу зростає рівень засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою та зростає загальний вміст GLUT-4 у

м'язовій тканині. Виявлено підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини та гексокіназної активності у клітинах печінки діабетичних щурів, що може свідчити про можливий безпосередній вплив фітокомпонентів *P. vulgaris* на перебіг інсулінозалежних процесів у клітинах-мішенях гормону в рамках використаної моделі ЦД. Встановлено, що регулярне введення екстракту лушпиння *P. vulgaris* протягом 28 днів щурам з ЦД 1 типу, окрім поліпшення стану системи антиоксидантного захисту (зменшення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів та нормалізація ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту) виявляє також нормалізуючу дію на перебіг імунних процесів, дисбаланс яких є невід'ємною патогенетичною ланкою запального процесу за умов розвитку ЦД. Відповідно до аналізу основних біохімічних показників сироватки крові, виявлено позитивний вплив екстракту на функціональний стан печінки щурів за ЦД 1 типу. Виявлені зміни біохімічних параметрів сироватки крові, які відображають стан ниркової функції, свідчать про вплив даного екстракту на метаболічні функції цього органу.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено спосіб отримання сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris*. Встановлені антидіабетичні властивості різної направленості сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* (антиоксидантні, протизапальні, гіпоглікемічні) дозволяють стверджувати про доцільність розробки фармацевтичного препарату на основі даної сировини, що може бути використано для лікування ЦД 1 типу та його ускладнень. Результати представленої роботи можуть бути використані в ході навчального процесу для студентів біологічних спеціальностей та студентів фармацевтичних та медичних навчальних закладів при розробці лекційних курсів з вивчення механізмів дії біологічно активних фітокомпонентів.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто проаналізовано наукову літературу за темою роботи, виконано експериментальні дослідження та здійснено підготовку матеріалів до публікації. Здобувачем

підготовлено доповіді, які включали результати досліджень, написано та подано до друку статті та тези в матеріалах конференцій та з'їздів. За участю співавторів публікацій проведено інтерпретацію отриманих результатів. Планування експерименту та розробка методичних підходів, формування ідеї роботи, узагальнення результатів досліджень та редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації доповідались на вітчизняних та міжнародних конференціях: XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 2014), IX Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекул до біосфери» (Харків, 2014), VII Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 2014), XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015), Міжнародній конференції для молодих учених «Сучасні проблеми мікробіології та біотехнології» (Одеса, 2015), Науково-практичній конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (Київ, 2015), XII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 18 наукових праць, у тому числі 10 статей у фахових вітчизняних та міжнародних періодичних виданнях, з яких 5 публікацій у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз, 1 стаття у нефарховому виданні та 8 тез у матеріалах з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 241 найменування. Робота викладена на 160 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 6 таблицями та 28 рисунками.

РОЗДІЛ 1

Патогенез розвитку цукрового діабету

Цукровий діабет (ЦД) – це ендокринне захворювання, пов'язане з багатостороннім порушенням на всіх ланках обміну речовин [1]. Етіологія цукрового діабету характеризується гетерогенністю, однак в клініці чітко розрізняють інсулінозалежну (тип 1) та інсулінонезалежну (тип 2) форми. ЦД 1 типу – це здебільшого хронічне аутоімунне захворювання, першопричиною розвитку якого вважається вірусна інфекція та/або стресові фактори на фоні спадкової схильності. ЦД 2 типу – комплекс метаболічних порушень, в основі яких лежить інсулінорезистентність та недостатність функції β -клітин. Однією з провідних причин ЦД 2 типу є ожиріння [6-8].

Цукровий діабет зустрічається у всіх частинах світу та серед різноманітних верств населення. Ця хвороба за поширеністю посіла третє місце в світі після серцево-судинних та онкологічних захворювань, що, безумовно, позиціонує її як серйозну загрозу для здоров'я людства [2].

1.1. Патогенез ушкодження панкреатичних β -клітин за умов цукрового діабету

Прогресивна деструкція панкреатичних β -клітин, головним чином шляхом апоптозу, є характерною як для ЦД 1 типу, так і для ЦД 2 типу. Ушкодження β -клітин за умов ЦД 2 типу скоріше є наслідком метаболічних ускладнень, тоді як дисбаланс імунних процесів є причиною розвитку ЦД 1 типу [9 - 11].

ЦД 1 типу – це аутоімунне захворювання, яке є Т-клітинно-опосередкованим результатом селективного руйнування клітин підшлункової залози [9 – 11]. CD4⁺ і CD8⁺ субпопуляції Т-лімфоцитів залучені до розвитку ЦД 1 типу [9 – 12]. Нативні CD4⁺ Т-лімфоцити, відомі як Т-хелперні (Th) клітини, після диференціації у вторинних лімфоїдних органах спеціалізуються у функціональні Th1 лімфоцити [11, 13]. На сьогодні достеменно відомо, що відмінними рисами патогенезу ЦД 1 типу є інфільтрація запальних клітин, зокрема Th1 лімфоцитів і макрофагів у відповідь на асоційовані антигени β-клітин з подальшим розвитком інсуліту [14]. Натомість, Th2 лімфоцити шляхом секреції цитокінів IL-4 та IL-10 здійснюють захисну дію по відношенню до інсулінопродукуючих клітин підшлункової залози [14, 15].

Ураження β-клітин головним чином відбувається за участю цитотоксичних ефекторних CD8⁺ Т-клітин (Т-кілерів) [15, 16]. З'ясування того, що аутореактивні клони CD8⁺ Т-клітин мурчаків з чітко вираженою аутоантигенною специфічністю (G9C8, NY8.3, AI4 [17-19]) є реактивними по відношенню до інсуліну, острівцево-специфічного білка, асоційованого з каталітичною субодиницею глюкозо-6-фосфатази (glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, IGRP) та DMK-кінази (dystrophia myotonica kinase, DMK), дало можливість вченим визначити роль CD8⁺ Т-клітин в патогенезі захворювання ЦД 1 типу. В ході ефекторної стадії захворювання аутореактивні CD8⁺ Т-клітини індукують загибель β-клітин внаслідок активування білками головного комплексу гістосумісності класу I (major histocompatibility complex, MHC) [16]. Цитотоксичні CD8⁺ Т-лімфоцити опосередковують загибель β-клітин шляхом екзоцитозу цитотоксичних гранул при контакті з ними – перфоринів і гранзимів [19]. Перфорини утворюють отвори в мембрані острівцевих β-клітин, що дає змогу цитотоксичним сериновим протеазам гранзимам потрапити та індукувати апоптоз β-клітин. Альтернативним перфорин-залежному шляху деструкції β-клітин CD8⁺ Т-лімфоцитами є Fas/FasL шлях. Fas-рецептори експресуються

на поверхні β -клітин, тоді як FasL-ліганди містяться на поверхні CD8⁺ Т-кілерів [19 – 22].

Загальновідомо, що CD4⁺ Т-лімфоцити забезпечують хомінг для ефektorних CD8⁺ клітин [16, 20]. Однак самостійно CD4⁺ Т клітини діють як на ранніх, так і на кінцевих стадіях патогенезу ЦД 1 типу. Аутореактивний вплив CD4⁺ клітин і макрофагів на β -клітини здійснюється шляхом синтезу таких прозапальних цитокінів, як інтерлейкін-1 (IL-1), інтерферон- γ (IFN- γ) і фактор некрозу пухлин α (TNF- α) – основних медіаторів, які призводять до руйнування β -клітин за умов ЦД 1 типу. Означені цитокіни діють на β -клітини через специфічні рецептори, запускаючи таким чином каскади сигнальних реакцій, які призводять до транскрипції специфічних для запалення білків [23]. Експериментально підтверджено, що піддавання ізольованих β -клітин впливу IL-1 β або IL-1 β у поєднанні з IFN- γ призводило до їх руйнування, аналогічну тому, як це відбувається в хворих на ЦД [24].

В панкреатичних β -клітинах IL-1 β активує транскрипційний ядерний фактор kb (NF-kb) [25]. Хоча базальна активність NF-kb необхідна β -клітинам для підтримки їх нормальної інсуліносекреторної функції, надмірна активація NF-kb індукує експресію гену індукцйбельної синтази оксиду азоту (iNOS) з подальшою генерацією NO [26]. Неконтрольований синтез молекул NO призводить до зниження рівня експресії факторів транскрипції, відповідальних за диференціацію і функції β -клітин (PDX-1 і Isl-1) [27, 28]. За умов цитокін-опосередкованої регуляції синтезу NF-kb здійснюється активація хемокінів, таких як білок-хемоаттрактант моноцитів-1 (MCP-1). Вплив IL-1 β також опосередковує активацію протеїнкінази c-Jun (JNK) – одного з компонентів сигнальної системи, яка запускає процеси деструкції β -клітин [27]. Зокрема, активована JNK-кіназа фосфорилує залишок Ser³⁰⁷ в складі субстрату інсулінового рецептора 1 (insulin reseptor substrate, IRS-1), послаблюючи таким чином сигнал від IRS-1, спрямований на активацію транскрипційного фактора PDX-1, відповідального за синтез інсуліну [29].

Глюкозотоксичність також призводить до надмірного утворення IL-1 β з подальшою активацією NF- κ B, що в кінцевому рахунку призводить до пригнічення Ca²⁺ помпи саркоплазматичного ретикулу, АТФази типу 2b (SERCA-2b) [30-32]. Зниження активності цього ферменту причиною виснаження запасів Ca²⁺ всередині люмену ЕПР та розвитку стресових реакцій, оскільки збільшення концентрації цитозольного Ca²⁺ індукує апоптичні процеси всередині β -клітин. Лактатдегідрогеназа А [33], мітохондріальний роз'єднувальний білок (UCP)-2 [34], а також транскрипційний фактор цАМФ-адапторний елемент-модулятор (CREM) [35] можуть активуватись за умов гіперглікемії, що призводить до порушень інсуліносекреторної функції β -клітин.

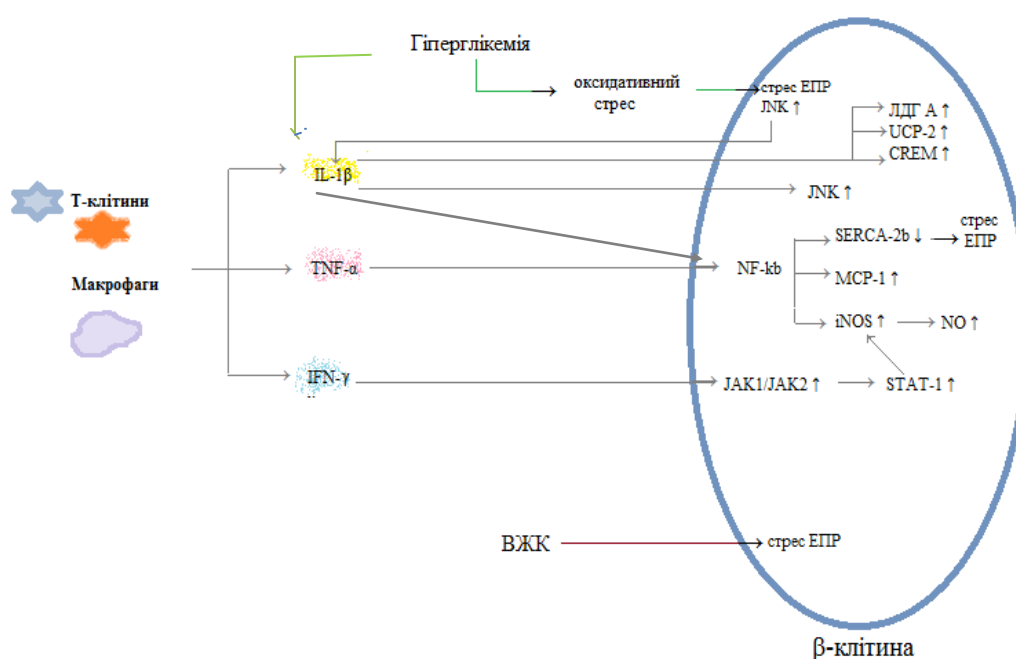


Рис. 1.1.1. Руйнування інсулінопродукуючих β -клітин підшлункової залози [35].

IFN- γ зв'язується з рецепторами клітинної поверхні і активує кінази JAK1 і JAK2, які фосфорилують транскрипційний фактор STAT-1. Після

активації утворений димер STAT-1 транслокується в ядро та активує сайт- γ , який здатний активувати різноманітні гени, у тому числі й експресію індукцибельної синтази оксиду азоту – iNOS [36, 37].

Цитокін TNF- α провокує хомінг лейкоцитів [38], активацію молекул МНС I острівців Лангенгарса [39,40], активацію T-клітин і антигенпрезентуючих клітин. CD4⁺ T-клітини шляхом продукування TNF- α активують дендритні клітини, NK-клітини і прозапальні макрофаги, спрямовані на знищення інсулінопродукуючих клітин. У свою чергу ефекторні CD8⁺ T-клітини секретують IFN- γ і TNF- α , таким чином активуючи презентацію аутоантигенів на поверхні дендритних клітин для посилення передачі Fas і МНС I сигналу від β -клітин, тим самим спричиняючи їх деструкцію [41,42].

Невід'ємними рисами ЦД 2 типу є інсулінорезистентність та зниження числа та функціональної активності β -клітин [43]. Хронічний характер інсулінорезистентних станів за умов активації апоптичних процесів у β -клітинах, а також в тому випадку, коли β -клітини виснажуються внаслідок надмірної декомпенсації зниженої чутливості периферичних клітин-мішеней до інсуліну, є передумовою розвитку ЦД 2 типу [43,44]. На сьогодні глюкоза та ліпотоксичність визнають основними факторами ушкодження β -клітин при ЦД 2 типу [45-47].

Глюкозотоксичність як ушкоджуючий фактор по відношенню до β -клітин обумовлений тим, що β -клітини містять високопроцесивні переносники глюкози ГЛЮТ-2 [45]. Таким чином безперервне надходження глюкози за градієнтом концентрації всередину інсулінопродукуючої клітини провокує надмірну стимуляцію синтезу та вивільнення інсуліну поряд з активацією процесів аутоокислення глюкози та неферментативного глікозилювання білків [46-48]. За умов гіперглікемії глюкоза неензиматичним шляхом здатна приєднуватись до молекули білка. Посилення процесів неферментативного глікозилювання полягає в основі структурних і функціональних пошкоджень клітини, оскільки призводить до

модифікації білків, в тому числі й тих, які беруть участь в регуляції транскрипції певних генів [48-54]. Зокрема, неферментативне глікозилювання транскрипційних факторів гену інсуліну та глюкокінази може бути причиною зниження їх синтезу в β -клітинах [52-54].

В умовах гіперглікемії внаслідок перевантаження циклу Кребса продуктами окиснення надлишкової кількості глюкози в клітині, до електрон-транспортного ланцюга мітохондрій надходить велика кількість донорів вільних електронів – НАДН та ФАДН₂. Ці електрони по електрон-транспортному ланцюгу переносяться на молекули кисню. Надмірна процесивність електрон-транспортного ланцюга мітохондрій є причиною зростання мембранного потенціалу до критичної межі з подальшим порушенням функціонування електронтранспортного ланцюга та утворення великої кількості активних форм кисню (АФК), що є причиною мітохондріальної дисфункції за умов ЦД [55].

За надмірного утворення у клітині АФК, а також NO в ході оксидативно-нітративного стресу інтенсифікуються процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), аберантної посттрансляційної модифікації білків та змін у клітинному сигналюванні, ушкодження структури ДНК. За даних умов активується полі-АДФ-рибозополімераза (poli-ADF-ribose polymerase, PARP) – фермент, який використовуючи НАДН як субстрат, опосередковує репарацію ушкодженої ДНК. При цьому недостатність відновних еквівалентів в клітині призводить до пригнічення активності ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, який є ключовим ферментом гліколітичного каскаду [55-57]. Внаслідок пригнічення активності цього ферменту надлишок глюкози метаболізується через альтернативні шляхи, що призводить до активації сорбітолового шляху обміну глюкози [58]. У процесі відновлення глюкози до сорбітолу за участі альдозоредуктази використовується велика кількість НАДФН, необхідного для відновлення глутатіону – універсального внутрішньоклітинного антиоксиданту [59]. Його недостатність суттєво ослаблює систему антиоксидантного захисту і таким чином підвищує

можливість пошкодження клітини внаслідок активації оксидативного стресу [60]. Оскільки β -клітини підшлункової залози містять вкрай низький рівень ферментів антиоксидантного захисту, вони є особливо чутливими до оксидативно-нітрозативного стресу [61].

Окрім глюкозотоксичності, висока концентрація в крові вільних жирних кислот (ВЖК) є ще одним фактором ушкодження β -клітин [62]. Токсичність ВЖК по відношенню до β -клітин була експериментально підтверджена: кількохгодинна предекспозиція β -клітин впливу ВЖК збільшувала глюкозостимульовану секрецію інсуліну; в той час як вплив ВЖК на інсуліносекретуючі острівці Лангенгарса протягом кількох діб знижував секрецію гормону [63]. Ліпотоксичність є наслідком активації процесів ліполізу в жировій тканині, що обумовлено інсулінорезистентним станом [63, 64]. Відомо, що на поверхні β -клітин містяться рецептори до вільних жирних кислот (free fatty acid receptor, FFAR-1), які залучені до регуляції вивільнення інсуліну у відповідь на підвищення концентрації ВЖК у крові [65]. Внутрішньоклітинний метаболізм ВЖК є джерелом синтезу ліпідних сигнальних молекул, таких як ацил-КоА та диацилгліцерол (ДАГ). Молекули ацил-КоА беруть участь в ацилюванні синаптосом-асоційованого білка-25 (SNAP-25) і синаптогаміну – білків, які беруть участь у збірці інсуліновмісних везикул. ДАГ, активуючи протеїнкіназу С, залучений до процесу секреції інсуліну [65, 66]. Надмірне надходження ВЖК всередину β -клітини є причиною гіперпродукції інсуліну, що обумовлює виснаження запасів гормону в цих клітинах [65-67].

ВЖК є причиною погіршення кальцієвого обміну в β -клітинах, оскільки можуть індукувати ЕПР-стрес, шляхом інгібування вивільнення Ca^{2+} з пулу ЕПР [68]. Також ліпотоксичність обумовлена надмірною акумуляцією жирових відкладень, що призводить до зростання секреції адипоцитами цитокінів – $\text{TNF}\alpha$, IL-6 , які можуть чинити ушкоджуючий вплив на інсулінопродукуючі клітини [69].

1.2. Патогенез інсулінорезистентності за умов цукрового діабету

Інсулінорезистентність – це порушення біологічної відповіді інсулінозалежних глюкозоутилізуючих тканин (жирової, м'язової та печінки), на дію інсуліну при його достатній концентрації в крові. Даний стан супроводжується порушенням інсулінозалежних метаболічних процесів організму, дисбалансом росту та диференціювання клітин [70]. Зниження чутливості периферичних тканин до дії інсуліну є передумовою розвитку компенсаторної гіперінсулінемії – посиленої продукції гормону β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози, що з часом призводить до виснаження їх резервів [71]. В клініці цей стан визначають як надфізіологічну концентрацію інсуліну в крові, необхідну для забезпечення рівня нормоглікемії [72]. Після цього відбувається послаблення інсулінопродукуючої функції β -клітин, яке є причиною розвитку відносної недостатності інсуліну та гіперглікемії [71].

Інсулінорезистентність є невід'ємним патологічним проявом ЦД 2 типу; на клітинному рівні проявляється у порушенні трансдукції сигналу від інсулінового рецептора і, як наслідок, численних метаболічних та мітогенних недоліків клітинної функції [73]. У генезі клітинної інсулінорезистентності виділяють порушення пререцепторного (аномальні молекули гормону) [74]; рецепторного (зменшення кількості рецепторів до інсуліну, дефектні форми інсулінових рецепторів і інсулін-рецепторного сигналу, порушення афінності інсулінових рецепторів) [73, 75-77]; і пострецепторного (порушення трансдукції інсулінового сигналу) [73, 78] рівнів. У генезі набутих форм інсулінорезистентності має значення, у першу чергу, пострецепторний механізм [78, 79].

Інсуліновий рецептор (ІР) (КФ 2.7.1.112) – це трансмембранний гетеротетрамерний протеїн, який складається з двох α - та двох β -субодиниць, зв'язаних дисульфідними містками [80]. Інсулін зв'язується з α -субодиницями ІР в позаклітинній частині та індукує тирозинкіназну активність

β -субодиниць у внутрішньоклітинному домені рецептора [80]. Дослідження *in vivo* свідчать про те, що за умов ЦД 2 типу IP в більшості випадків є нечутливим до дії інсуліну внаслідок токсичного впливу ВЖК, оскільки накопичення у внутрішньоклітинному пулі ВЖК або їх метаболітів призводить до послаблення IRS/PI3K сигналу та порушення транслокації GLUT-4 до клітинної мембрани [81-83].

Більшість метаболічних ефектів інсуліну опосередковуються шляхом фосфорилування білків-субстратів IP (IRS) [80]. Причиною порушень пострецепторних взаємодій інсуліну з IP також можуть бути мутації IRS білків [84]. Показано, що відсутність IRS-1 у мишей супроводжується інсулінорезистентністю головним чином м'язової та жирової тканини, в той час як у IRS-2-нокаутних мишей більш вираженою є інсулінорезистентність з боку печінки в поєднанні з порушенням функцій β -клітин [84-86]. Спираючись на дослідження *in vitro*, на сьогодні відомо, що серинове фосфорилування IRS-1 може призводити до дисоціації між комплексом IP/IRS-1 та/або IRS-1/PI3-кіназа, запобігаючи таким чином подальшій трансдукції сигналу та підвищуючи деградацію IRS-1 [87]. Рівень фосфорилування IRS по залишкам серину корелює з вмістом внутрішньоклітинних серинових кіназ [88]. Серед причин, які можуть індукувати даний патологічний ефект, можуть бути гіперінсулінемія, гіперглікемія, гіперліпідемія; надмірна процесивність кіназ p70S6, mTOR, IKK, JNK; а також запальний процес, мітохондріальна дисфункція, та ін [89-94]. Крім того, існують дані стосовно дисфункції IRS в скелетних м'язах внаслідок ліпотоксичності [95]. Зокрема, циркуляція ВЖК і фактора некрозу пухлин- α (TNF- α) може збільшувати серинфосфорилування білків IRS [88].

Фосфорилування IRS в подальшому активує фосфатидилінозитол-3-кіназу (PI3). Активована PI3-кіназа генерує фосфатидилінозитол-3,4-бісфосфат (PIP2) і фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3)], які зв'язуються з фосфатидилінозитол-залежною кіназою 1 (PDK1). Субстратами PDK є кіназа Akt та протеїнкіназа C (ПКК) [94, 95].

Серин-треонінова протеїнкіназа Akt опосередковує такі процеси, як синтез глікогену і пригнічення глюконеогенезу в печінці; активує транслокацію білка-транспортера глюкози GLUT-4 до клітинної мембрани [95, 96]. Дослідження з використанням Akt-нокаутних мишей свідчать про те, що відсутність ізоформи Akt1 не викликала будь-яких істотних метаболічних порушень, в той час як нокаутні миші по ізоформі Akt2 мали важку інсулінорезистентність, яка фенотипово нагадувала ЦД 2 типу [97]. При дослідженні успадкування людських мутацій пост-рецепторних подій сигналіngu IP виявлено міссенс-мутації в кінзному домені Akt2 в родинах пацієнтів з важким перебігом інсулінорезистентності [98].

Судячи з клінічної картини більшості хворих, які страждають на ЦД 2 типу, гіперглікемія корелює з підвищеним рівнем продукції глюкози печінкою внаслідок резистентності до інсуліну [99]. Такий ефект пов'язаний з порушенням інгібування двох ключових ферментів глюконеогенезу: фосфоенолпіруваткарбоксікінази (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)

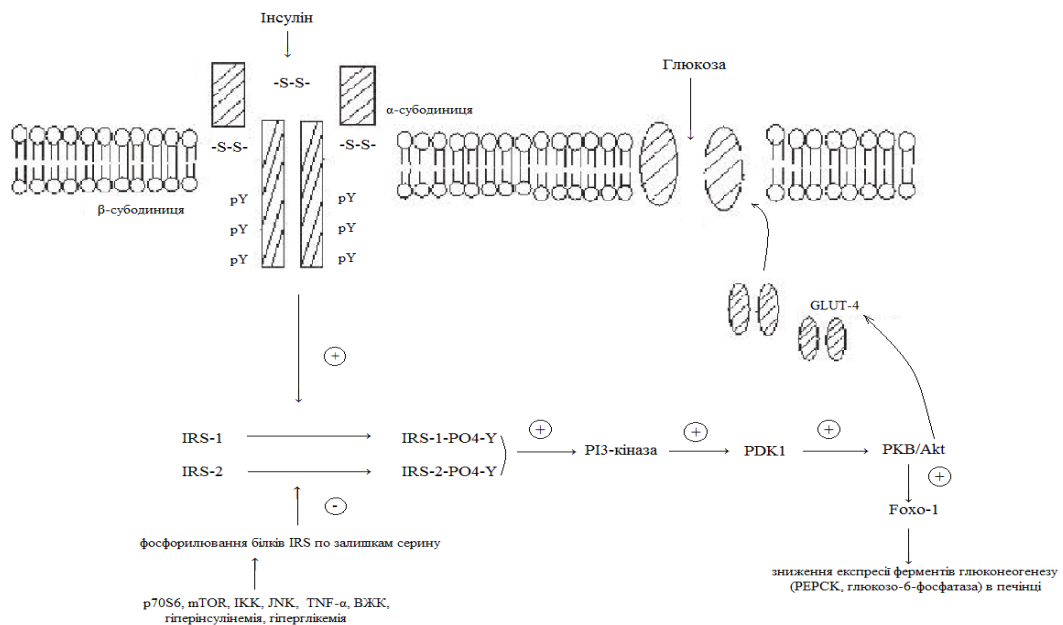


Рис. 1.2.1. Порушення трансдукції інсулінового сигналу на пострецепторному рівні [116]

і каталітичної субодиниці глюкозо-6-фосфатази [99, 100]. Встановлено, що Foxo-протеїни є компонентом інсулінозалежної регуляції експресії генів ферментів, залучених до глюконеогенезу і інсулінорезистентності [101]. Відомо, що порушення фосфорилування Foxo1 кіназою Akt унеможливує його подальше потрапляння в ядро та активацію транскрипції генів, які регулюють експресію ферментів глюконеогенезу [102].

Механізм, який висвітлює ВЖК-індуковану інсулінорезистентність, залишається до кінця нез'ясованим, однак може бути пов'язаний зі збільшенням рівня інтрамітоцелюлярних ліпідних метаболітів – ацил-КоА і диацилгліцеролу (ДАГ) [103]. Означені молекули можуть запускати каскади серин-треонінових кіназ, що, як було зазначено, призводить до порушення проведення інсулінового сигналу на рівні IRS [88-90]. Експериментально підтверджено, що збільшення рівня ДАГ в м'язах корелює з активацією нових ізоформ PKC та відбувається внаслідок інфузій ліпідів та за умов висококалорійної дієти [104]. У передачі інсулінового сигналу серед усіх ізоформ PKC, ключову роль відіграють nPKC [105]. Експериментально виявлено зв'язок між nPKC і ВЖК-індукованою резистентністю до інсуліну: інфузія ліпідів щурам знижувала інсулін-стимульоване засвоєння глюкози м'язовою тканиною; за даних умов спостерігали одночасну активацію PKC θ і PKC δ [106, 107].

За нормальних фізіологічних умов PDK1 може безпосередньо фосфорилувати всі PKC включаючи nPKC [108]. Встановлено, що ізотип PKC ϵ пов'язаний з резистентністю до інсуліну, оскільки також може фосфорилуватись PDK1-незалежним шляхом – за умов впливу ВЖК [109]. В дослідженнях, проведених на клітинній лінії HEPG2, показано, що їх інкубація з міристиновою кислотою призводила до міристилювання PKC ϵ та подальшого її конститутивного фосфорилування по залишкам Thr566/Ser729 в кіназному домені [109]. В підтвердження того, що вищезазначені процеси є абсолютно незалежними від PDK1, є демонстрація подібного процесу з використанням PDK1-нокаутних клітин, за винятком застосування

пальмітату [110]. Таким чином, ВЖК індукують PDK1-незалежне фосфорилування ферменту PKC ϵ , який, в свою чергу транслокується ядро та пригнічує транскрипцію генів IP.

Одним із важливих регуляторів глюкозного гомеостазу є білок PGC-1 – коактиватор рецептора активації проліферації пероксисом PPAR- γ , транскрипційних факторів із родини ядерних гормональних рецепторів, які виступають центральними регуляторами ліпідного та вуглеводного обміну [111]. В експериментах *in vitro* доведено вирішальну роль PGC-1 в стимуляції експресії генів GLUT-4 в м'язових клітинах. Крім того, PGC-1 опосередковує інтеграцію ефектів глюкокортикоїдів та цАМФ на експресію генів глюконеогенезу в печінці [112, 113]. PGC-1 регулюється Akt і Foxo-1, відіграє певну роль в регуляції генів, відповідальних за процеси окисного фосфорилування, зниження експресії яких, зазвичай, має місце за умов ЦД 2 типу. Таким чином, мітохондріальна дисфункція є важливим патогенетичним фактором у розвитку інсулінорезистентності при ЦД [113-115].

Механізм розвитку інсулінорезистентності у хворих на ЦД 1 типу є менш вираженим, ніж у ЦД 2 типу. Вважається, що генез інсулінорезистентності за умов ЦД 1 тісно пов'язаний з гіперглікемічними станами, які є передумовою глюкозотоксичності [116]. Однак існують також свідчення на користь того, що зниження утилізації глюкози і порушення інсулінозалежної утилізації жирних кислот в крові є незалежним від глікемічного контролю, оскільки резистентність до цього гормону в печінці і скелетних м'язах все ж мають місце навіть за умов компенсації глікемії при ЦД 1 типу [117]. Показано, що інсулінорезистентні стани при ЦД 1 типу є наслідком впливу супрафізіологічного рівня екзогенного інсуліну при інсулінотерапії та ожиріння [117-120].

Скелетний м'яз відіграє ключову роль у визначенні системної інсулінорезистентності при ЦД 1 типу, оскільки саме цією тканиною засвоюється до 80% глюкози внаслідок стимуляції інсуліном [120, 121]. Однією з причин зниження засвоєння глюкози м'яцями за умов ЦД 1 типу

є порушення інсуліностимульованої регуляції синтезу мРНК GLUT-4 та його транслокації [121-123]. Показано, що у хворих з діагнозом ЦД 1 типу, які страждають ожирінням, рівень білка GLUT-4 в скелетних м'язах є нижчим, порівняно з огрядними хворими, які страждають ЦД 2 типу [122]. Інші дослідження, проведені на щурах із змодельованим ЦД 1 типу, свідчать про те, що порушення процесів транслокації GLUT-4 корелює з використанням більш високих доз екзогенного інсуліну [123, 124]. У мишей з моделлю ЦД 1 типу, за умов лікування інсуліном спостерігали серин-індуковане фосфорилування IRS-1 і зниження транспорту глюкози, подібно до того, яке спостерігалось в ЦД 2 типу [125]. Вважається, що порушення сигналіngu за умов ЦД 1 типу може також бути викликане ліпотоксичністю, зокрема збільшенням концентрації ВЖК в плазмі крові та інтраміоцелюлярних ліпідів в м'язах [126]. За даних умов активуються серинові протеїнази, такі як ІкВ кіназа- β , які фосфорилують серинові сайти фосфорилування в складі IRS-1, знижуючи таким чином транспорт глюкози у GLUT-4-вмісних везикулах в міоцити, з наступною гіперглікемією [127]. Відомо, що за ЦД 2 збільшення рівня інтраміоцелюлярних ліпідів в скелетних м'язах також пов'язане з розвитком інсулінорезистентності та порушенням сигналізації в скелетних м'язах [128].

Доведено, що інсулінорезистентність в клітинах печінки має місце як за умов ЦД 1 типу, так і при ЦД 2 типу [129-132]. Печінка відіграє вирішальну роль в регуляції гомеостазу глюкози за рахунок регулювання глюконеогенезу і глікогенолізу [129]. Інсулін пригнічує глюконеогенез за допомогою інгібування ферменту фосфоенолпіруват-карбоксикінази і сприяє синтезу глікогену шляхом стимуляції кінази-3 глікогенсинтази і пригнічення глюкозо-6-фосфатази [130]. У щурів під час ЦД 1 типу ці процеси порушуються за умов впливу більш високих доз інсуліну, що також є причиною порушення тирозин-фосфорилування інсулінового рецептора в печінці [131].

Отже, ЦД є гетерогенним захворюванням, тому при виборі лікування необхідно використовувати комплексну терапію, спрямовану як на усунення інсулінорезистентних станів та зниження токсичних впливів на β -клітини підшлункової залози, так і на попередження метаболічних ускладнень ЦД. Через невідоме зростання захворюваності на ЦД пошук нових ефективних засобів корекції ЦД становить актуальну задачу.

РОЗДІЛ 2

Фітозасоби у лікуванні цукрового діабету

Як допоміжні засоби при лікуванні ЦД широко використовують лікарські рослини. Призначення рослинних препаратів не є альтернативою застосування інсуліну та синтетичних цукрознижувальних засобів, однак фітотерапія здатна проявити суттєву підтримку стандартному способу лікування на всіх стадіях захворювання [132].

Антидіабетична дія рослин обумовлена наявністю в них широкого спектру біологічно активних речовин: вітамінів, ферментів, гормонів, макро- і мікроелементів, алкалоїдів, ефірних олій, фітонцидів. При цьому точні механізми антидіабетичної дії окремих лікарських рослин вивчені недостатньо. Гіпоглікемічні властивості фітопрепаратів можуть бути обумовлені посиленням синтезу інсуліну та оптимізацією його дії на рівні тканин, стимуляцією процесів регенерації β -клітин; регуляцією імунних процесів, інгібуванням надмірної ліпопероксидації, а також нормалізацією вторинних порушень обміну речовин і продукції гормонів, що забезпечує профілактику ускладнень зі сторони різних органів і систем організму в цілому. У багатьох випадках фітотерапія попереджує розвиток уражень серцево-судинної системи, діабетичних нейро-, ретинопатій, уражень нирок, печінки, метаболічного синдрому [133-135].

З урахуванням фармакологічних властивостей і та фітохімічного складу, рослини, що виявляють антидіабетичну дію, умовно поділено на декілька груп [136]:

-Рослини загальнозміцнювальної дії (родіола рожева, елеутерокок колючий, женьшень, аманиха висока, ромашка лікарська). Позитивна дія цих рослин пов'язана зі стимуляцією обміну речовин у різних органах і системах;

- Рослини, які мають і своєму складі інсуліноподібні або інші гормоноподібні речовини (фітогормони): листя чорниці, кропива дводомна, коріння лопуха великого, кульбаба, квасоля звичайна, насіння льону посівного, коренів солодки тощо. Їх біологічна дія зазвичай супроводжується вираженим гіпоглікемічним ефектом;

- Рослини регулятори обміну речовин, «очищувачі» організму: звіробій, пирій, подорожник, льон тощо;

- Рослини, збагачені на вітаміни, органічні кислоти та інші біологічно активні речовини, які підвищують захисні сили організму (шипшина, суниця, малина, брусниця, горобина, смородина тощо).

Лікарським рослинам притаманна полівалентність дії, що обумовлює їх сприятливий вплив на декілька патогенетичних ланок захворювань та їх ускладнень.

2.1. Фітозасоби, які виявляють свою антидіабетичну дію шляхом нормалізації вторинних ускладнень цукрового діабету

Детальні дослідження фітосировини, яка виявляє свою антидіабетичну дію шляхом нормалізації вторинних ускладнень ЦД, також є актуальними, адже попередження цих ускладнень не лише шляхом гіпоглікемічної дії, але й завдяки зниженню оксидативного стресу і депресії ферментів глюконеогенезу віддаляє появу ЦД [136, 137]. Зокрема, флавоноїди кверцетин і міртилін, виділені з чорниці звичайної (*Vaccinium myrtillus*), позиціонуються як ефективні інгібітори альдозоредуктазної активності. Доказом того є їх яскраво виражені терапевтичний, а також профілактичний ефекти при патології діабетичної нефропатії шляхом зниження рівня окислювального стресу [138]. Розмаринова кислота, ізольована з наземної частини материнки звичайної (*Origanum vulgare*), флавоноїди непетрин та непетин, ізольовані з розмарину лікарського (*Rosmarinus officinalis*),

виявляють потужну інгібуючу дію по відношенню до альдозоредуктази [139, 140]. Водний екстракт листя *R. officinalis* завдяки своїм вираженим антиоксидантним властивостям знижував СС14-індуковану нефротоксичність у білих нелінійних щурів [140]. Показано, що розмаринова кислота інгібуює клубочкову гіпертрофію і значно зменшує гломерулосклероз у щурів за умов цукрового діабету [141, 142, 143]. Доведено, що ізокверцетин та інші флавоноїди гірчаку перцевого (*Polygonum hydropiper*) інгібують активність альдозоредуктази, а також виявляють протекторні властивості по відношенню до впливу оксиду азоту (NO) та малонового диальдегіду (МДА) у печінці та нирках мишей [144]. Також було показано, що внаслідок впливу ізокверцетину підвищується активність ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази та каталази [144].

До рослин, що найчастіше згадуються в літературі як ефективні антидіабетичні фітозасоби та виявляють свою дію шляхом нормалізації вторинних ускладнень ЦД, належить виноград звичайний (*Vitis vinifera L.*), відомий своїми антиоксидантними, антиканцерогенними та гіпотензивними властивостями [145-147]. У науковій літературі часто обговорюють терапевтичні властивості екстракту виноградних кісточок, які є багатим джерелом поліфенолів, 90% з яких проціанідини [145]. Виявлено гіполіпідемічні властивості екстракту виноградних кісточок. Експерименти, проведені на модельних щурах, яких утримували на висококалорійній дієті, показали, що даний екстракт знижує рівень ЛПНЩ та тригліцеридів [146]. Таким чином, даний фітопрепарат може бути ефективним для полегшення таких вторинних ускладнень ЦД, як атеріальна гіпертензія та метаболічний синдром.

Позитивний терапевтичний ефект екстрактів листя, квітів і плодів глоду кривочашечкового (*Crataegus curvisepala*) виявлено при лікуванні серцево-судинної недостатності як в Східній, так і Західній медицині [148]. Результати клінічних досліджень за участі хворих на ЦД 2 типу, які страждали від гіпертонічної хвороби, свідчить, що прийом хворими

гіпоглікемічних препаратів в поєднанні з екстрактом глоду (1200 мг/кг) більш ефективно знижував рівень глюкози та виявляв гіпотензивний ефект, ніж за умов прийому лише гіпоглікемічних препаратів [148]. Позитивна дія екстракту глоду також підтверджена за умов гіперліпідемії та атеросклерозу у щурів. Цей екстракт знижував рівень тригліцеридів, ЛПНЩ та холестеролу, а також запобігав накопиченню холестерину в печінці щурів [149].

2.2. Фітозасоби, які виявляють пряму антидіабетичну дію

Антидіабетичний ефект гуньби сінної (пажитника, *Trigonella foenum graecum*) виявлено відносно недавно. Насіння гуньби містить алкалоїд тригонелін, нікотинову кислоту (вітамін РР), рутин, стероїдні сапоніни і фітостерини, флавоноїди, слиз (до 30 %) і гіркі речовини, діосгенін, ямогенін, гітогенін, тігогенін і глікозиди діосцин, фітостерин [150, 151]. 4-Гідроксилейцин – це амінокислота, що міститься в насінні пажитника та стимулює глюкозо-стимульоване вивільнення інсуліну ізольованими β -клітинами острівців Лангенгарса *in vitro* та *in vivo*. Було встановлено, що антигіперглікемічний ефект гуньби сінної досягається завдяки уповільненому засвоєнню в шлунково-кишковому тракті харчових волокон, а також інгібуванню ферментів вуглеводного обміну. Алкалоїд трігонеллін, який також міститься в насінні гуньби сінної, виявляє гіпоглікемічні властивості, а стероїдні сапоніни, як і клітковина, сприяють затримці спорожнення шлунка [152]. В сучасній науковій літературі неодноразово описувались гіпоглікемічні та гіпохолестеринемічними ефекти насіння пажитника на різних тваринних моделях (миші, щури, кролі та собаки), а також на людях [152-154]. Згідно результатів клінічних досліджень, споживання насіння пажитника в якості дієтичної добавки підвищує толерантність до глюкози у пацієнтів, хворих на ЦД [154]. Показано, що прийом водного екстракту цього

насіння хворими на ЦД знижував рівень тригліцеридів, ЛПНЩ та рівень глюкози натще за даних умов [155].

У коренях реп'яха або лопуха справжнього (*Arctium lappa L.*) міститься до 45% інуліну, слиз, фенольні сполуки, серед яких є фенолкарбонові кислоти (кавова, хлорогенова та галова), флавоноїди (лютеолін, кемпферол, кверцитин, гіперозид та рутин), дубильні речовини, гіркоти, до 0,2% ефірної олії, вітаміни С та В, органічні кислоти, смоли, макро- та мікроелементи [156].

Показані антидіабетичні властивості реп'яха, а також його нормалізуючі ефекти на ускладнення цукрового діабету [157,158]. Експерименти, проведені на щурах із стрептозотоцин-індукованим ЦД, свідчать, що арктійн – сполука, виділена з сухого насіння *Arctium Lappa L.*, знижує рівень глюкози та глікозильованого гемоглобіну у сироватці крові тварин. Ця сполука також знижувала в'язкість крові, набряк та загин сітківки ока, рівень експресії фактора росту ендотелію (VEGF) в сітківці ока щурів із змодельованою діабетичною ретинопатією [157].

Інша біологічно активна речовина, виділена з наземної частини лопуха справжнього, це арктігенін, який відомий своїми протипухлинними, протизапальними та антидіабетичними ефектами. Показано, що арктігенін стимулює поглинання глюкози як в культурі L6 скелетних м'язів, так і в ізольованих м'язах [158]. Ця сполука також інгібувала глюконеогенез і синтез ліпідів у первинній культурі гепатоцитів [159]. Хронічне введення арктігеніну знижувало рівень глюкози в крові та покращувало ліпідний обмін у мутантних *ob/ob* мишей, які є моделлю ЦД 2 типу, в той час його одноразове пероральне введення ефективного інгібувало глюконеогенез у печінці мишей дикого типу [160]. Відомо, що біологічні ефекти арктігеніну пов'язані зі здатністю даної сполуки активувати 5'-АМФ-активовану протеїнкіназу (AMP-activated protein kinase, АМПК) – висококонсервативну серин/треонінову протеїнкіназу, яка бере участь в регуляції енергетичного гомеостазу клітини [160, 161]. На тваринних моделях інсулінорезистентності

та ЦД 2 типу показано, що активація АМРК корелює з відновленням гомеостазу глюкози, нормалізацією ліпідного профілю крові і кров'яного тиску [160]. Більш того, АМРК активується основними цукрознижувальними препаратами, в тому числі тіазолідиндіонами та бігуанідом метформіном, а також інсуліночутливим адипокіном адипонектином. Ці дані свідчать про можливість розробки препаратів, мішенню дії яких є АМРК, направлених на лікування ЦД 2 типу та метаболічного синдрому [160]. Однак необхідно зазначити небажані побічні ефекти з боку серцево-судинної системи, ризику збільшення ваги тіла, а також можливі канцерогенні ефекти.

У народній медицині відвар та настій з корення лопуха також широко використовують при артриті, ревматизмі, псоріазі [162]. Такий настій виявляє протизапальну, спазмолітичну, полівітамінну, загальнозміцнювальну дію. Показано, що коріння лопуха виявляє також антибактеріальну, імуностимулюючу та антифунгіцидну дію [163].

Топінамбур (*Helianthus tuberosus*) зменшує синтез тригліцеридів і жирних кислот в печінці і знижує їх рівень у крові щурів [164]. Крім того, показано зниження рівня глюкози натще у сироватці крові здорових людей [165]. Основним компонентом, завдяки якому топінамбур виявляє антидіабетичні інсуліноподібні властивості, є інулін. Це олігосахарид, який складається з 30-35 залишків D-фруктози, лінійно сполучених між собою β -1,2 глюкозидними зв'язками, а також α -1,2 глюкозидними зв'язками з кінцевою молекулою D-глюкози. Дана рослина також багата на калій, залізо, кремній, цинк, що сприяє нормалізуючій дії топінамбура на електrolітний обмін [165, 166].

Часник посівний (*Allium sativum*) здавна відомий багатьма терапевтичними властивостями: протимікробною, антитромботичною, антиоксидантною, гіпохолестеринемічною, гіпотензивною, а також гіпоглікемічною. Більшу частину лікувальних властивостей *A. sativum* пов'язують з наявністю сірковмісних сполук, зокрема алліцину (аліл-2-пропентіосульфонат) [167]. Гіпоглікемічні властивості алліцину

пов'язують з його здатністю стимулювати вивільнення інсуліну. На різних тваринних моделях показано, що пероральне споживання етанольного екстракту, соку та олії часнику чинить значний цукрознижувачий ефект за рахунок стимуляції інсулінової секреції β -клітинами підшлункової залози у здорових тварин та на стрептозотоцин- а також алоксан-індукованої моделях діабету [167-169]. В експериментах на щурах встановлено, що алліцин у дозі 200 мг/кг виявляє свої антидіабетичні властивості майже в тій же мірі ефективно, як глібенкламід та інсулін [167].

У дослідах *in vitro* показано, що алліїн (S-аліл-L-цистеїн сульфоксид), попередник алліцину, також може стимулювати секрецію інсуліну ізольованими β -клітинами підшлункової залози щурів [168]. Відмічено й потужні антиоксидантні властивості даної сполуки [169].

Численні дослідження свідчать, що водний екстракт *A. sativum* може сприяти покращенню ліпідного обміну шляхом впливу на печінковий метаболізм, а саме – зниження експресії білка LXR α (livers X receptors) у печінці [170]. Рецептори LXR α (NR1H3) і LXR β (NR1H2)) належать до суперсімейства ядерних рецепторів і є важливими регуляторами гомеостазу холестерину, тригліцеридів і глюкози. Активація даних рецепторів синтетичними агоністами має такі наслідки, як гіпертригліцеридемія, високий рівень ліпопротеїдів низької щільності, стеатоз печінки та порушення обміну холестеролу. Вважається, що інгібування LXR α на фоні його активації в інших тканинах організму, зокрема кишечника, призводить до зниження ліпідного профілю [171]. Цей позитивний ефект важливий при терапії діабету, а також серцево-судинних захворювань. Показана також ефективність екстракту *A. sativum* при зниженні рівня гіпертрофії наднирників, гіперглікемії у мишей, що було викликано шляхом іммобілізаційного стресу [172]. Встановлено, що споживання олії *A. sativum* також призводило до поліпшення утилізації глюкози в умовах тесту на толерантність, проведеного на кролях [173].

Плоди та листя чорниці звичайної (*Vaccinium myrtillus*) здавна використовуються в традиційній медицині, особливо при вторинних ускладненнях діабету [174, 175]. Препарати із плодів даної рослини ефективні при ретинопатіях, сприяють зниженню артеріального тиску, мають також протизапальний, спазмолітичний, сечогінний, протиалергічний ефекти [175].

V. myrtillus містить широкий спектр поліфенольних сполук, включаючи антоціанозиди, флавоноїди, вітаміни, цукри і пектини, які містяться у плодах, кверцетин, катехіни, дубильні речовини, іридоїди, кислоти, які знаходяться у листі [174]. Хоча серед складових даної рослини виділяють кілька фармакологічно активних компонентів, більшість досліджень зосереджені саме на антоціанозидах [175, 176]. Екстракти *V. myrtillus*, які містять антоціанозиди, є потужними антиоксидантами. Ці активні компоненти також стабілізують колагенові волокна, сприяють біосинтезу колагену, знижують проникність і ламкість капілярів, інгібують агрегацію тромбоцитів [177]. Біологічно активні компоненти *V. myrtillus* запобігають вивільненню та синтезу прозапальних сполук, таких як гістамін, простагландини і лейкотрієни; інгібують накопичення сорбітолу, забезпечуючи таким чином захист від судинних і неврологічних ускладнень цукрового діабету [178]. Антоціанозид міртилін є одним з найбільш активних гіпоглікемічних компонентів *V. myrtillus* [178]. Показано, що поліфеноли чорниці виявляють антидіабетичні властивості: знижують рівень інсулінорезистентності та інгібують процеси ліпопероксидації у хворих на метаболічний синдром [179]. Показано, що разова доза антоціан-збагаченої фракції чорниці значно знижувала рівень глюкози в крові як діабетичних *C57BL/6* мишей, так і в тварин з дієт-індукованим ожирінням [180]. Пероральне введення відвару листя чорниці також знижувало рівень гіперглікемії у собак [181]. Антидіабетичну активність екстрактів чорниці звичайної пов'язують також зі здатністю інгібувати α -амілазну активність та активувати людський рецептор активації проліферації пероксисом (PPAR- γ). Відомо, що активація

рецепторів PPAR- γ призводить до стимуляції жирового обміну та зниження інсулінорезистентності [182].

Серед біологічно активних компонентів кропиви дводомної (*Urtica dioica* L.) виявлено каротиноїди, вітаміни групи В, С і К, мурашину, пантотенову, кавову, *n*-кумарову, ферулову та інші органічні кислоти, протопорфірин, копропорфірин, ситостерин, глікозид уртицин, залізо, фітонциди, кверцетин, ацетилхолін, гістамін та 5-гідрокситриптамін. *U. dioica* володіє кровоспинними, сечогінними та загальнозміцнювальними властивостями, має жовчогінну дію [183]. Показано, що водний екстракт свіжого листа *U. dioica* має гіпоглікемічну та протизапальну дію, також нормалізує ліпідний обмін за умов стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів [184]. Гістологічні дослідження свідчать про репаративні властивості як водного, так і етанольного екстрактів сухого листа *U. dioica* по відношенню до підшлункової залози на вищезгаданій моделі [184, 185]. Результати *in vitro* досліджень свідчать про те, що екстракти *U. dioica* підвищують утилізацію глюкози та інгібують α -амілазну активність [186].

Однак дані щодо антидіабетичних властивостей *U. dioica* є суперечливими, оскільки окремі дослідники не виявляли гіпоглікемічну дію водно-спиртового екстракту листа *U. dioica* при експериментальному цукровому діабеті 1 типу [187].

Кориця (*Cinnamomum burmannii*) не є характерним представником флори України, проте є доступним та широкоживаним гіпоглікемічним фітозасобом серед населення, хворого на ЦД. Ряд експериментальних та клінічних досліджень з використанням лабораторних тварин та культур клітин підтверджують інсуліноподібну активність екстракту кориці за умов ЦД 2 типу [188-190]. Показано, що екстракт кориці підвищує метаболізм глюкози в жирових клітинах, збільшує рівень аутофосфорилування інсулінового рецептора, інгібує активність тирозинпротеїнфосфатаз, підвищує рівень поглинання глюкози і синтезу глікогену, активацію глікогенсинтази та інгібування кінази глікогенсинтази-3 [190-193].

Встановлено, що умовах *in vivo* екстракт кориці підсилював інсулін-стимульовану утилізацію глюкози щурів, які утримувались на дієті з високим вмістом фруктози [194]. Показано зниження рівня глюкози з одночасним підвищенням рівня інсуліну, а також зниження артеріального тиску у сироватці крові щурів внаслідок впливу цього екстракту [195].

Розторопша плямиста (*Silybum marianum*) відома широким спектром терапевтичних властивостей, зокрема антиканцерогенних, протизапальних, імуномодуючих, противірусних [196]. Слід зазначити, що *S. marianum* шикоро застосовується при багатьох хворобах печінки, які характеризуються морфофункціональними порушеннями даного органу, в тому числі некротичними ураженнями [197]. Основними діючими речовинами плодів розторопші є флавоноїди (таксифолін, кверцетин, дегідрокемпферол), флаволігнани (силібін, силідіанін, силікрістин), біогенні аміни (тіамін, гістамін) та вітаміни К, А, Е [196]. Найбільш широким спектром лікувальних властивостей характеризуються лікарські препарати *S. marianum* на основі речовин флавоноїдної природи, зокрема силімарину, який містить ізомери флаволігнанів [197]. Численні експерименти доводять, що силімарин здатний усувати абсцеси, контролювати харчові та сезонні алергії, знижувати рівень холестерину та є антидотом аманітових отрут [197-199]. Експерименти з використанням лабораторних щурів свідчать, що силібінін, один з ізомерів силімарину, чинить протекторну дію за умов цисплатин-індукованої нефротоксичності [200]. Показано, що силімарин виявляє стимулюючу дію на клітини нирок (лінія *Vero*, немалігнізовані клітини нирок мавпи) та на клітини печінки. Інтоксикація клітин нирок *in vitro* парацетамолом, цисплатином та вінкрістином значно знижувалась при введенні силімарину [198]. Антиоксидантні властивості силімарину обумовлені здатністю активних фітокомпонентів відновлювати глутатіон, інгібувати активність деяких ферментів, залучених у формування вільних радикалів кисню, таких як ксантинооксидаза і цитохром Р-450, а також знижувати рівень експресії TNF- α [200].

Останнім часом дослідження терапевтичної дії розторопші зосереджені на її антидіабетичних властивостях. Показано, що етанольний екстракт сухого листа *S. marianum* знижує рівень глюкози та холестеролу у щурів за умов аллоксан-індукованого ЦД [201]. Дослідження, проведені із залученням пацієнтів, хворих на ЦД 2 типу, свідчать, що за умов довготривалого споживання силімарину знижувався рівень глікозильованого гемоглобіну та рівень глюкози натще [202]. Інші дослідники вказують на здатність силімарину інгібувати токсичні ефекти аллоксану та циклоспорину на панкреатичні клітини різних тварин за досліджуваних умов [203]. Таким чином, гіпоглікемічні властивості розторопші плямистої потребують подальших досліджень.

У традиційній медицині суниця лісова (*Fragaria vesca*) відома широким спектром своїх лікувальних властивостей. Як плоди, так і настої, отримані з листа *F. Vesca*, є ефективними при захворюваннях щитоподібної залози, підвищеному артеріальному тиску, порушеннях сольового обміну [204]. Вони мають також бактерицидні, протизапальні, імуномодулюючі та потужні антиоксидантні властивості [204]. Останнім часом *F. vesca* позиціонується також як ефективний гіполіпідемічний засіб. Показано, що водний екстракт *F. vesca* ефективно знижував рівень холестеролу, ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності у щурів з дієт-індукованим ожирінням [205]. У той же час в науковій літературі бракує інформації стосовно можливих механізмів гіпоглікемічної дії *F. vesca*. Ця рослина є популярним антидіабетичним засобом серед населення України, яке страждає на ЦД. Таким чином, дослідження в даному напрямку можуть бути цікавими.

F. vesca містить фенольні сполуки, головним чином флавоноїди (кверцетин, рутин), водорозчинні таніни (елаготаніни), фенольні кислоти (хлорогенова, саліцилова, глюкуронова), конденсовані таніни (проантоціанідіни), а також антоціаніни [204]. Важливі в терапевтичному плані фенольні кислоти, які містяться у плодах суниці лісової – елаготаніни і глюкозиди еллагової кислоти, в організмі метаболізуються до еллагової

кислоти. Еллагові кислоти відомі своїми антимуtagenними та антиканцерогенними властивостями [206]. Флавоноїди кверцетин і кампферол, поряд з іншими поліфенолами, що містяться в суниці, є потужними антиоксидантами та можуть чинити сприятливий вплив при ЦД [207]. Можливо, антидіабетична дія суниці лісової зумовлена також наявністю в її складі хлорогенової кислоти, яка, як відомо, має виражену цукрознижувальну дію завдяки здатності інгібувати глюкозо-6-фосфатазу, що каталізує кінцевий етап глікогенолізу та глюконеогенезу [208].

Перспективною рослинною сировиною для отримання цукрознижувальних препаратів є квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris*) [209-219]. У харчовій промисловості ця рослина є цінною культурою, оскільки боби квасолі є джерелом незамінних амінокислот, зокрема лейцину, треоніну, серину, аспарагінової кислоти, аргініну. Крім того, насіння та оплодні квасолі містять вітаміни А, В, Е, С та є багатими на азотвмісні сполуки – бетаїн та алантоїн (5-уреї-діомідазолідин-2,4-діон). У сім'долях бобів знайдено пектин – β -1,4-D-галактуронову кислоту. Боби квасолі є багатими на мінеральні речовини: К, Са, Р, Fe, Mn, Cu, S, Mg, однак містять і слідові кількості Со та Se. За вмістом Cu та Zn – особливо цінного мікроелементу при ЦД, квасоля перевищує більшість овочів [216].

У надземній частині різних видів та сортів квасолі виявлені флавоноїди та кумарини. З листя *P. vulgaris* виділені 3-глюкуроніди кверцетину та кемпферолу, ізокверцетин, кемпферол, робінін. У рослинах роду квасоля виявлено апігенін, лютеолін, кверцетин, рутин, мірицетин, даїдзєїн та куместрол, а також астрагалозид, ізомірицитрин, кемпферол-3-ксило-глюкозид, ізофлавонони, ізофлаванони, куместани та птерокарпани. Виділені та ідентифіковані хінна, корична, шикімова, хлорогенова, п-кумарова, кавова та неохлорогенова кислоти. За допомогою газорідинної хроматографії виділені бурштинова, глюконова, треонова кислоти та спирт інозит [217].

Повідомлялось, що гіпоглікемічна дія цієї рослини може бути зумовлена флавоноїдами, такими як антоціаніни та флавонол, проантоціанозидами, танінами, глікозидами, а також широким спектром фенольних кислот [209].

На сьогодні механізм гіпоглікемічної дії *P. vulgaris* залишається недостатньо вивченим. Сучасні літературні дані свідчать про два можливі механізми терапевтичного ефекту квасолі за умов цукрового діабету.

Перший пов'язаний з присутністю серед активних компонентів *P. vulgaris* інгібіторів α -амілази [5, 210, 211]. Одним із шляхів поліпшення компенсації глікемічних параметрів за умов ЦД є прийом цукрознижуючих препаратів, які інгібують α -амілазну та α -глюкозидазну активності, пригнічуючи в даний спосіб вивільнення додаткових порцій глюкози в кровотік. Такими препаратами є акарбоза, міглітол та воглібоза. Амілаза та глюкозидаза – це ферменти, які функціонують у тонкому кишечнику та беруть участь у метаболізмі вуглеводів. Амілазна активність опосередковує розпад вуглеводів до олігосахаридів. Зокрема панкреатична α -амілаза каталізує гідроліз α -(1,4)-глікозидних зв'язків полімеру крохмалю. Глюкозидази каталізують розпад олігосахаридів до моносахаридних одиниць. Мальтаза (α -глюкозидаза) здійснює гідролітичне розщеплення мальтози на дві молекули глюкози, також діючи і на інші α -D-глюкозиди [210]. Відомо, що харчові продукти, які містять в собі легкозасвоювані вуглеводи, вважаються висококалорійними та характеризуються високим глікемічним індексом [210]. Надзвичайно важливо обмежувати споживання таких продуктів хворим на ЦД, оскільки внаслідок дії інгібіторів α -амілазної активності відбувається затримка спорожнення шлунка, що в результаті призводить до подовження відчуття ситості та зниження споживання їжі.

Значної уваги приділяють дослідженням глікопротеїнів бобів *P. vulgaris*, які здатні інгібувати α -амілазну активність [209-213]. Відомо про наявність щонайменше трьох ізоформ інгібіторів α -амілази: α -A1, α -A12, α -AII. Показано, що ізоформа α -A1, яка знаходиться у сім'ядолях бобів та попереджує гідроліз крохмалю рослинними α -амілазами, інгібує активність

α -амілази в організмі людини, сповільнюючи таким чином засвоєння крохмалю. Це, в свою чергу, призводить до зниження рівня глікемії. На основі даних інгібіторів створений повноцінний фармацевтичний продукт, який має назву фазеоламін [4, 210].

Інший механізм антидіабетичного ефекту *P. vulgaris* пов'язаний з дією фітогемаглютиніну, що може зв'язуватись з клітинами шлункового епітелію та слизової кишечника, призводячи до стимуляції вивільнення холецистокініну і глюкагонподібного пептиду – гормонів, які відіграють ключову роль у процесах травлення та харчової поведінки [4].

Існують свідчення на користь того, що квасоля виявляє ліпоксигеназну активність через наявність в своєму складі глікозиду соєвого сапоніну V. Доведено потужні антиоксидантні властивості різних відварів квасолі. Відомо, що використання настою лущиння квасолі призводить до підвищення рівня інсуліну в крові [214].

Науковий інтерес до антидіабетичного потенціалу стручків *P. vulgaris* значно зріс за останні десять років. Показано гіпоглікемічний ефект водного екстракту лущиння квасолі на кролях (4 мл/кг) [215]. Доведено й гіпоглікемічний ефект водного екстракту лущиння *P. vulgaris*, який вводили щурам із стрептозотоцин-індукованим діабетом [216, 218, 219]. Однак існують також і суперечливі факти на користь цукрознижувальних властивостей *P. vulgaris*. Так, при проведенні тесту на толерантність до глюкози на мишах не було виявлено ефекту водного екстракту лущиння квасолі навіть в дозі 25 г/кг [217]. Отже, вивчення гіпоглікемічних властивостей відвару лущиння квасолі є незавершеним, а отже актуальним.

Узагальнюючи наведені дані, можна визнати, що поширені на території України рослини, які застосовуються при ЦД, виявляють різнопланову метаболічну, регуляторну дію та, безумовно, є джерелом пошуку нових ще більш ефективних медикаментозних засобів терапії даного захворювання.

РОЗДІЛ 3

Матеріали та методи дослідження

3.1. Реактиви та матеріали

В роботі використовували такі реактиви: 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота (HEPES), трис(гідроксиметил)амінометан, етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), бичачий сироватковий альбумін (БСА), Твін-20, Тритон X-100, глікоген, глюкозо-6-фосфат, УДФ-глюкоза, глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа, фосфоенолпіруват, піруваткіназа, лактатдегідрогеназа, нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений (НАДН), нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат (НАДФ), виробництва фірми «Sigma», США. Тіобарбітурова кислота виробництва фірми «Merck», Німеччина.

Моноклональні мишині антитіла проти щурячого інсулінового рецептора, моноклональні кролячі антитіла проти щурячого інсуліну, моноклональні кролячі антитіла проти щурячого білка-транспортера глюкози – GLUT-4 виробництва фірми «Millipore», США; моноклональні бичачі антитіла проти щурячого IFN- γ , моноклональні бичачі антитіла проти щурячого IL-1 β , моноклональні мишині антитіла проти щурячого IL-4, моноклональні мишині антитіла проти щурячого IL-10, моноклональні мишині антитіла проти щурячого Ig класу G, поліклональні кролячі антитіла проти щурячого IL-12 виробництва фірми «Santa Cruz Biotechnology», США. Поліклональні анти-мишині, анти-кролячі, анти-бичачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому; субстрат для пероксидази хрому *o*-фенілдіамін (OPD) виробництва фірми «Sigma», США. Рецептор епідермального фактора росту (EGFR), poly-(Glu, Tyr) – специфічний субстрат для тирозинової

протеїнкінази, анти-фосфотирозинові антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, аденозин-5'-трифосфат (АТФ) виробництва фірми «Sigma», США.

Хроматографічний носій: Сефадекс G-25 виробництва фірми «Sigma», США.

Стрептозотонин виробництва фірми «Sigma», США. Розчин інсуліну з активністю 100 МО/мл виробництва фірми «Ново-Нордіск», Данія. Стандартні набори для визначення біохімічних показників сироватки крові виробництва фірми «Human GmbH», Німеччина. Тіопентал натрію виробництва фірми «Київмедпрепарат», Україна; розчин глюкози 40%, розчин адреналіну 0,18%, розчин пероксиду водню (H_2O_2) 3% виробництва фірми «Дарниця», Україна; набір для визначення концентрації глюкози глюкооксидазним методом у біологічних рідинах виробництва фірми «Філісіт-Діагностика», Україна.

Решта хімічних реактивів (солі, кислоти, луги) були вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче ч.д.а.

3.2. Обладнання

У роботі використовували прилади і обладнання наступних виробників: центрифуги CM-6M виробництва фірми «ELMI», Латвія, Allegra 64R виробництва фірми «Beckman Coulter», США; апарат для ліофільної сушки рідких препаратів The Telstar LyoQuest виробництва фірми «Telstar», Іспанія; мікропланшетний рідер виробництва фірми «БіоТес», США; хроматограф «Bio Logic LP», спектрофотометр «Smart Spec Plus» виробництва фірми «Bio Rad», США; біохімічний аналізатор Microlab 300 виробництва фірми «ELITechGroup», Франція; глюкометр Gluco Dr. auto (AGM-4000), виробництва фірми «Allmedicus Co., Ltd», Корея.

Пластиковий лабораторний посуд – планшети для імуноферментного аналізу, епандорфи, пробірки та інше, отримано від фірми «Sente-Lab»,

Україна. Скляний лабораторний посуд – колби, стакани, пробірки, циліндри та інше, виробництва фірми «Simax», Чехія.

3.3. Одержання водних екстрактів чорниці звичайної, суниці лісової, кропиви дводомної, квасолі звичайної, розторопші плямистої та часнику посівного

Наважку (20 гр) сухої сировини наземної частини чорниці звичайної та суниці лісової, сухого листя кропиви дводомної, сухих стулок плодів квасолі звичайної та сухих плодів розторопші плямистої поміщали у скляний термостійкий посуд і заливали 200 мл окропу. Посудину щільно закривали і настоювали на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Потім екстракти охолоджували при кімнатній температурі протягом 45 хв і фільтрували [220].

Водний екстракт плодів часнику посівного отримували згідно [221]. Свіжі цибулини часнику очищували від лушпиння. До наважки часнику (100 гр) додавали 250 мл води та подрібнювали, використовуючи автоматичний блендер. Отриману суспензію фільтрували і використовували для дослідження гіпоглікемічних ефектів рослинних екстрактів.

Рослинна сировина наземної частини чорниці звичайної, листя кропиви дводомної та сухих плодів розторопші плямистої була виробництва фірми «Ліктрави», Україна. Підтвердження систематичного положення часнику посівного, суниці лісової та квасолі звичайної проводили на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

3.4. Одержання сухого екстракту квасолі звичайної

Для приготування екстракту 132 гр подрібненого сухого лушпиння квасолі звичайної заливали 1 л окропу [222]. Посудину щільно закривали і настоювали на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Потім екстракт

охолоджували при кімнатній температурі 25°C. Отриманий екстракт фільтрували через кілька шарів марлі та центрифугували при 1000g протягом 10 хв для позбавлення грубих залишків рослинної сировини. Супернатант заморожували, після чого висушували шляхом ліофілізації. У результаті описаних вище маніпуляцій отримали 8 г сухого екстракту, який зберігали при -20°C. У дослідженнях використовували свіжоприготовані водні розчини сухого екстракту.

3.5. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин

При роботі з лабораторними тваринами дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986). Експериментальні роботи зі щурами проводили у віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Роботи з тваринами регламентувались правилами проведення експериментальних робіт з піддослідними тваринами, які було затверджено вченою Радою цього закладу, які в свою чергу узгоджувались з чинним законодавством України, прийнятим на той період.

3.6. Умови проведення досліджень на щурах

Досліди проводили на білих нелінійних щурах віком від 2 до 3 місяців з масою 120-300 г. Дослідних тварин утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Під час експериментів тварини

знаходились при кімнатній температурі 19-24°C, вологості не більше 50%, природному світловому режимі «день-ніч» у пластикових клітках. Перед проведенням експериментів тварини проходили акліматизацію в кімнаті для проведення досліджень протягом 7 діб.

3.7. Визначення толерантності до глюкози

При проведенні тесту на толерантність до глюкози використовували тварин, які за 6 год до початку експерименту мали доступ лише до води. Щури були анестезовані за допомогою інтраперитонеального введення тіопенталу натрію у дозі 40 мг/кг. В межах однієї дослідної групи використовували 6 тварин.

Визначали базальний рівень глікемії у щурів, після чого тварини перорально отримували 2 мл водного розчину глюкози у дозі 3 гр/кг. Концентрацію глюкози визначали через кожні 30 хв досліді протягом наступних 2 годин. Забір крові здійснювали через хвостову вену [223].

3.8. Визначення концентрації глюкози в крові щурів

Визначення концентрації глюкози в цільній крові проводили глюкооксидазним методом, за допомогою глюкометра Gluco Dr. auto (AGM-4000), виробництва фірми «Allmedicus Co., Ltd», Корея. Всі процедури були проведені згідно з інструкцією приладу.

3.9. Визначення токсичності екстракту квасолі звичайної

Вивчення параметрів гострої токсичності екстракту лушпиння квасолі звичайної проводили за умов його внутрішньошлункового введення щурам, з використанням таких доз екстракту: 200 мг/кг, 1 г/кг та 2 г/кг [224]. В межах однієї дослідної групи використовували 18 тварин. З метою визначення можливих токсичних ефектів біологічно активних речовин екстракту на організм щурів, їх стан порівнювали з групою щурів, які замість екстракту отримували воду. Постійне спостереження за тваринами здійснювали протягом перших чотирьох годин після введення екстракту/води. Впродовж наступної доби здійснювали погодинну перевірку стану тварин. Спостереження за тваринами продовжували протягом 14 днів. У ході дослідження оцінювали загальний стан щурів, виживаність, динаміку споживання щурами води та корму.

Для визначення сироваткових біохімічних маркерів гострої токсичності та більш віддалених ефектів токсичного ураження від кожної з груп щурів, що отримували відповідну дозу екстракту, рандомізовано відбирали і умертвляли по 6 тварин через 4 години, 1 добу та 14 діб після введення екстракту. По закінченні досліду також проводили макроскопічну оцінку стану внутрішніх органів дослідних щурів, вилучали печінку та нирки з метою їх зважування та визначення вагових коефіцієнтів.

3.10. Умови відтворення моделі цукрового діабету 1 типу

Експериментальний ЦД 1 типу індукували шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення розчину стрептозотоцину з розрахунку 4,5 мг на 100 г маси тіла тварини [225]. Щурам контрольної групи означеним вище способом вводили 10 мМ цитратний буфер (рН 4,5), який використовували для розчинення стрептозотоцину. Через дві доби після індукції ЦД у крові експериментальних тварин перевіряли рівень глікемії

натще. У досліджах використовували щурів, діапазон концентрації глюкози у крові яких становив 22-32 ммоль/л після 6-годинного голодування.

3.11. Умови проведення експерименту для дослідження впливу екстракту квасолі звичайної

Сухий екстракт квасолі звичайної вводили тваринам перорально, у вигляді водного розчину в дозі 200 мг/кг маси тіла. Досліджували ефекти екстракту як за умов однократного, так і при його довготривалому введенні протягом 28 діб контрольним щурам та тваринам з моделлю ЦД 1 типу. Були також сформовані відповідні групи контрольних та діабетичних тварин, які замість екстракту перорально отримували воду.

При довготривалому експерименті екстракт вводили перорально в один і той самий час один раз на добу. В ході дослідження було сформовано 4 групи щурів, по 10 тварин в кожній: 1 – «Контроль»; 2 – «Контроль+*P. vulgaris*»; 3 – «Діабет»; 4 – «Діабет+*P. vulgaris*».

В ході довготривалого експерименту в усіх чотирьох досліджуваних групах тварин щодоби визначали кількість спожитого корму та води. Один раз на тиждень натще встановлювали масу тіла щурів.

В кінці кожного з експериментів через 24 год від останнього введення екстракту тварин виводили з експерименту шляхом декапітації.

3.12. Отримання сироватки крові щурів

Сироватку крові щурів отримували з цільної крові. Для вилучення супутніх білків та фібриногену кров залишали при 37° С протягом 30 хвилин, після чого зразки центрифугували при 2500 g протягом 15 хв. Отриманий супернатант (сироватку) негайно відокремлювали від формених елементів крові і заморожували при -20°С для подальших аналізів [6].

3.13. Визначення біохімічних показників сироватки крові щурів

Біохімічні показники сироватки крові щурів (вміст загального білка, альбуміну (мг/л), загального та прямого білірубіну (мкмоль/л), креатиніну (мкмоль/л), сечовини та сечової кислоти (ммоль/л), концентрації ліпопротеїнів високої та низької щільності, тригліцеридів, холестеролу (ммоль/л), активність аланін- та аспартатамінотрансферази, γ -глутамілтранспептидази, альфа-амілази, лужної фосфатази (од/л)) визначали спектрофотометрично на біохімічному аналізаторі Microlab 300, виробництва фірми «ELITechGroup», Франція. У ході дослідження використовували стандартні набори Human GmbH, Німеччина.

3.14. Визначення цитокінового профілю, вмісту інсуліну та імуноглобулінів класу G у сироватці крові щурів

Визначення цитокінового профілю, вмісту інсуліну та імуноглобулінів класу G (IgG) у сироватці крові щурів здійснювали за допомогою методу імуноферментного аналізу за загальною методикою для розчинних білків, який проводили у 96-лункових мікропланшетах з сорбційною здатністю для розчинних білків [226].

Сироватку попередньо розводили в десять разів 50 мМ Трис-НСІ буфером (рН 7,4), який містив 150 мМ NaCl. Зразки в об'ємі 100 мкл інкубували в лунках мікропланшета при 4°C протягом ночі. Після інкубації для видалення незв'язаного матеріалу лунки промивали буфером такого складу: 50 мМ Трис-НСІ буфер (рН 7,4) з 150 мМ NaCl та 0,05% Твін-20. Блокування неспецифічних місць зв'язування здійснювали шляхом інкубації з 5% розчином знежиреного молока при 37°C протягом 1 год. Після промивання в окремі лунки мікропланшета вносили первинні анти-інсулінові

кролячі антитіла, анти-IgG мишині антитіла, анти-IFN- γ бичачі антитіла, анти-IL-1 β бичачі антитіла, анти-IL-4 мишині антитіла, анти-IL-10 мишині антитіла, анти-IL-12 кролячі антитіла. Інкубація тривала при 37°C протягом 1 год. По закінченню часу інкубації, лунки мікропланшету промивали та вносили до них відповідні вторинні анти-кролячі, анти-мишині, анти-бичачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому та інкубували при 37°C протягом 1 год. Візуалізацію зв'язування вторинних антитіл проводили шляхом додавання в лунки 100 мкл розчину OPD в концентрації 0,4 мг/мл, приготованому на цитратному буфері (pH 5,0) з вмістом 0,013% H₂O₂. Пероксидазну реакцію зупиняли через 10 хв шляхом додавання 100 мкл 1М H₂SO₄. Оптичну щільність вимірювали при 492 нм. Вміст інсуліну, цитокінів та IgG виражали в ум.од. у перерахунку на вміст загального білка в сироватці крові, який визначали методом Бредфорд.

3.15. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну у крові щурів

Вміст глікозильованого гемоглобіну в крові щурів визначали спектрофотометрично згідно з методикою [227]. В ході роботи використовували стандартні набори виробництва фірми «Lachema» (Чехія).

Метод визначення глікозильованого гемоглобіну базується на тому, що стабільна форма глікогемоглобіну (HbA_{1c}) містить 1-дезоксигуанозид-1-(N-валіл)фруктозу, яка дегідратується фосфорною кислотою з утворенням забарвленого комплексу зі спектром поглинання при 433 нм. Визначенню глікозильованого гемоглобіну не заважає ні лабільна форма глікогемоглобіну, ні фетальний гемоглобін.

Вміст загального гемоглобіну визначали спектрофотометрично. Для цього змішували 20 мкл цільної крові з 5 мл трансформуючого розчину. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм проти трансформуючого

розчину. Концентрацію загального гемоглобіну розраховували згідно рекомендацій фірми-виробника, за формулою:

$$Hb = \frac{A * 367,7}{4,92} ,$$

де Hb – загальний гемоглобін, A – оптична щільність досліджуваної проби. Вміст загального гемоглобіну виражали у г/л.

Приготування гемолізату здійснювали шляхом додавання до щойно зібраної крові антикоагулянта 3,8% розчину цитрату Na з розрахунку 1:10. Після цього відбирали 1 мл стабілізованої крові і центрифугували при 1000 g протягом 10 хв, видаляючи таким чином плазму. До отриманого осаду еритроцитів додавали 3 мл фізіологічного розчину, суміш обережно перемішували, після чого знову центрифугували, як було описано вище. До осаду додавали 3 мл дистильованої води, суміш інтенсивно струшували та залишали при кімнатній температурі протягом 10 хв. Після чергового центрифугування відбирали 1,5 мл надосадової рідини (гемолізату) і змішували з 0,25 мл 85% розчину фосфатної кислоти. Після цього пробірки закривали гумовими пробками та поміщали в киплячу водяну баню на 30 хв. Після дегідратації пробірки охолоджували в проточній воді протягом 10 хв. До зразків додавали 0,5 мл 2,45 M розчину трихлороцтової кислоти. Вміст пробірок інтенсивно струшували та центрифугували при 1000 g протягом 20 хв. Після цього аліквоту надосадової рідини, об'ємом 1 мл, переносили в окремі сухі пробірки і змішували з 2,5 мкМ розчином тіобарбітурової кислоти. Вміст пробірок ретельно перемішували та інкубували при 37°C протягом 40 хв. Такі ж маніпуляції проводили і для контрольних проб, в які замість кислоти вносили воду (K1), до K2 – вносили кислоту та суміш гемолізатів з різних проб. Оптичну щільність проб вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 443nm проти дистильованої води.

Вміст глікозильованого гемоглобіну розраховували за формулою:

$$\text{HbA1c} = \frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{\text{Hb} * K},$$

де A_1 – оптична щільність досліджуваної проби, A_2 – оптична щільність проби контролю на реактиви, A_3 – оптична щільність проби позитивного контролю, K – тангенс кута нахилу, обрахований згідно з калібрувальним графіком за фруктозою, Hb – вміст загального гемоглобіну.

Вміст глікозильованого гемоглобіну виражали в мкмоль фруктози/г гемоглобіну.

3.16. Визначення засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою щурів

Визначення засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою щурів проводили згідно [228]. Перед початком досліджень тварини впродовж 20 год та мали доступ лише до води. Щурів декапітували, після чого обережно вилучали діафрагму, уникаючи пошкоджень печінкової вени та кровотечі. Тканину негайно поміщали у холодний бікарбонатний буфер Кребса-Рінгера (рН 7,4), видаляли зайву сполучну тканину та надто тонкі ділянки м'язу. Після цього діафрагму розділяли на дві гемідіафрагми, кожну з яких зважували. З метою відмивання від молочної кислоти перед початком дослідження тканину преінкубували при 4°C протягом 20 хв в 5 мл охолодженого буфера Кребса-Рінгера (рН 7,4), який містив 6 мМ глюкозу. В подальшому гемідіафрагми промивали від залишків глюкози в такому ж буфері, але без глюкози, та поміщали в інкубаційне середовище, яке являло собою Кребс-Рінгер буфер (рН 7,4), що містив 6 мМ глюкозу, та інкубували протягом 2 год при 37°C та постійній аерації середовища. Об'єм інкубаційного середовища

складав 2,5 мл. В момент початку інкубації та через 2 год відбирали аліквоти проб від інкубаційного середовища. Концентрацію глюкози в них визначали глюкооксидазним методом з використанням набору реактивів виробництва фірми «Філісіт-Діагностика», Україна. Результати представлені як споживання глюкози ммоль/гр тканини.

3.17. Отримання гомогенатів нирок, печінки та м'язової тканини

Загальні гомогенати нирок, печінки та м'язової тканини отримували згідно [229].

Виділення органів та отримання гомогенатів проводили при температурі 1-4°C. Гомогенізацію тканин здійснювали в 50 мМ Трис-НСІ буферному розчині (рН 7,4), який містив 140 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА. Об'єм використаного буфера у мл у 5 разів перевищував масу ізольованих органів у г.

Ізольовану печінку промивали холодним фізіологічним розчином (0,9% NaCl) з допомогою шприца через воротну вену. Подрібнену печінку переносили в гомогенізатор із слабо притертим тефлоновим поршнем і гомогенізували в охолодженому буфері.

Ізольовану м'язову тканину (стегновий м'яз) промивали в охолодженому фізіологічному розчині, очищали від сполучної тканини, подрібнювали ножицями та гомогенізували в охолодженому буфері за допомогою автоматичного подрібнювача протягом 35-45с. Отриманий гомогенат фільтрували через 4 шари нейлону.

Ізольовану пару нирок промивали холодним фізіологічним розчином, очищали від жирової тканини та подрібнювали ножицями. Подрібнену тканину переносили в гомогенізатор із слабо притертим тефлоновим поршнем і гомогенізували в охолодженому буфері.

Загальні гомогенати нирок, печінки та м'язової тканини центрифугували при 600 g протягом 15 хв. Осад відкидали, а надосадову рідину збирали і знову центрифугували при 15000 g протягом 15 хв. Ці дві процедури дозволяють позбавитись ядерної та мітохондріальної фракції. Аліквоти отриманих гомогенатів були заморожені в азоті.

3.18. Отримання грубої мембранної фракції клітин м'язової тканини

Методику проведення розділення цитозольної та грубої мембранної фракції проводили згідно [230].

Грубу мембранну фракцію клітин м'язової тканини осаджували центрифугуванням постмітохондріальної фракції клітин (отримання описано в п. 3. 17.) при 40000 g протягом 40 хв. Осад (грубу мембранну фракцію) ресуспендували у мінімальному об'ємі 50 мМ Трис-НСІ буфера (рН 7,4). Для відокремлення мембранозв'язаних білків від ліпідного шару зразки грубої мембранної фракції солюбілізували у присутності 1% неіонного детергенту Тритону Х-100 при 4°С протягом 20 хв. Для осадження несолубілізованого матеріалу лізат клітин центрифугували при 40000 g протягом 40 хв. Отриманий супернатант заморожували в азоті і використовували в подальших дослідженнях як мембранну фракцію.

3.19. Визначення вмісту глюкозного транспортера ГЛЮТ-4 та інсулінового рецептора у м'язовій тканині щурів

Загальний вміст глюкозного транспортера ГЛЮТ-4 та вміст інсулінового рецептора в мембранній фракції клітин м'язової тканини щурів визначали методом імуноферментного аналізу [226]. Як антиген використовували солюбілізований білковий матеріал, розведений до

концентрації білка 10 мкг/мл за допомогою 50 мМ Трис-НСІ буфера (рН 7,4), який містив 0,15 М NaCl. Досліджувані зразки об'ємом 100 мкл інкубували в лунках 96-лункового планшету протягом ночі при 4°C. Для детекції вмісту ГЛЮТ-4 у зразках використовували первинні кролячі поліклональні антитіла проти щурячого ГЛЮТ-4, які виявляли за допомогою вторинних анти-кролячих антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому. Для детекції вмісту інсулінового рецептора у зразках використовували первинні мишині моноклональні антитіла проти щурячого інсулінового рецептора, які виявляли за допомогою вторинних анти-мишиних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому. Як субстрат пероксидазної реакції у роботі використовували розчин OPD. Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм. Значення оптичної густини були використані для вираження вмісту ГЛЮТ-4 (ум.од.) у перерахунку на мг білка в досліджуваних пробах.

3.20. Визначення загальної тирозинпротеїнкіназної активності у м'язовій тканині щурів

Загальну тирозинпротеїнкіназу (ТПКазну) активність визначали за допомогою методу імуноферментного аналізу [226] в мембранній фракції клітин м'язової тканини щурів. В лунки мікропланшету вносили по 100 мкл розчину тирозинпротеїнкіназного субстрату – poly-(Glu, Tyr), з концентрацією 200 мкг/мл та інкубували при 37°C протягом 12 годин. Після видалення розчину субстрату лунки планшету промивали 10 мМ Na-фосфатним буфером (рН 7,4), який містив 0,05 % Твін-20 та висушували протягом 2 год при 37°C. Після цього в усі лунки вносили по 100 мкл інкубаційного середовища, яке містило 50 мМ HEPES (рН 7,4), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мМ MnCl₂, 0,2 мМ Na₃VO₄ и 35 нМ АТФ. Реакцію фосфорилування ініціювали додаванням в середовище інкубації 20 мкл джерела ферментативного білку та витримували при 37°C протягом 45 хв. Всі

наступні маніпуляції здійснювали згідно стандартних етапів постановки імуноферментного аналізу. Для детекції фосфорильованих у ході реакції залишків тирозину, в лунки вносили по 100 мкл розчину моноклональних анти-фосфотирозинових антитіл, кон'югованих с пероксидазою хрому та інкубували при 37°C протягом 45 хв. Як субстрат пероксидазної реакції використовували розчин OPD. Через 10 хв реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 0,3 М H₂SO₄. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 450 нм. ТПК-азну активність обраховували, використовуючи стандарт – очищений рецептор епідермального фактора росту з відомою ТПК-азною активністю, яку виражали у пмоль Фн на 1 мг білка за 1 хв.

3.21. Визначення гексокіназної активності у печінці та м'язовій тканині щурів

Гексокіназну активність визначали ферментативним методом, який передбачає використання системи ферментів фосфорилування глюкози та відновлення НАДФ [231].

До 0,2 мл інкубаційного середовища, що містило 30 мМ Трис-НСІ (рН 7,5), 15 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкози, 2,5 мМ АТФ, 0,6 мМ НАДФ, 0,5 Од. глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, додавали зразок тканинного гомогенату з вмістом 20 мкг білка.

Оптичну щільність проб вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм одразу після внесення білкового препарату та по закінченню часу інкубації, який становив 30 хвилин при 37°C.

Про швидкість реакції фосфорилування глюкози судили по накопиченню у середовищі інкубації НАДФН. Концентрацію НАДФН, що утворився в результаті реакції, визначали за калібрувальним графіком, побудованим із використанням стандартних розчинів НАДФН (мкмоль/л).

Активність ферментів фосфорилування глюкози виражали у мікромолях

НАДФН у перерахунку на 1 мг білка за 1 хв.

3.22. Визначення глікогенсинтазної активності у печінці та м'язовій тканині щурів

Глікогенсинтазну активність встановлювали за кількістю УДФ, що вивільнився з комплексу УДФ-глюкоза, як запропоновано у роботі [232]. Концентрацію вільного УДФ визначали спектрофотометричним методом, який базується на використанні спряженої системи ферментативних реакцій, що поєднують фосфорилування УДФ та окиснення НАДН [233].

Інкубаційне середовище для визначення глікогенсинтазної активності у загальному об'ємі 0,5 мл містило: 50 мМ Трис-НСІ (рН 7,4), 12,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЕДТА, 2,5 мМ β -меркаптоетанол, 1,2 мМ NaF, 1% глікоген (в/о), 0,75 мМ УДФ-глюкозу, 10 мМ глюкозо-6-фосфат. Реакцію запускали додаванням тканинного гомогенату (вміст білка в пробі складав 20 мкг) з подальшою інкубацією протягом 30 хв при 37°C. Реакцію зупиняли нагріванням реакційного середовища на киплячій водяній бані протягом 1 хв. Для осадження білків проби центрифугували при 400 g протягом 10 хв.

У надосадовій рідині визначали вміст вільного УДФ, що утворився в результаті гідролізу комплексу УДФ-глюкоза. Для цього 50 мкл супернатанту переносили до 150 мкл реакційного середовища наступного складу (наведені кінцеві концентрації): 15 мМ $MgCl_2$, 70 мМ KCl, 10 Од. піруваткінази, 0,18 мМ фосфоенолпіруват, 0,18 мМ НАДН та 5 Од. лактатдегідрогенази.

Оптичну щільність проб вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм одразу після внесення супернатанту та по закінченню часу інкубації, який становив 30 хв при 38°C. Про вміст вільного УДФ судили по швидкості окиснення НАДН. Концентрацію НАДН, що був використаний у результаті реакції, визначали за калібрувальним графіком, побудованим із

використанням стандартних розчинів НАДН (мкмоль/л).

Глікогенсинтазну активність виражали у мікромолях НАДН у перерахунку на 1 мг білка за 1 хв.

3.23. Визначення вмісту малонового діальдегіду у печінці та нирках щурів

За температури кипіння у кислому середовищі малоновий діальдегід (МДА) реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи при цьому забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм. Молярний коефіцієнт цього комплексу – $1,56 \cdot 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ [234].

Досліджувані проби (гомогенат печінки, нирок) у об'ємі 400 мкл та 1,6 мл 25 мМ Трис-НСІ буфера (рН 7,4) з вмістом 0,175 М КСІ, поміщали у центрифужні пробірки і осаджували білок додаванням 0,8 мл 20% трихлороцтової кислоти. Утворений осад осаджували центрифугуванням при 3000 g протягом 10 хв. Аліквоту надосадової рідини об'ємом 2 мл переносили в термостійкі пробірки, додавали по 1 мл 0,8% водного розчину ТБК. Контрольна проба замість надосадової рідини містила буферний розчин. Проби поміщали на 10 хв в киплячу водяну баню до появи рожевого забарвлення в зразках, охолоджували до кімнатної температури і вимірювали оптичну густину при 532 нм проти контрольної проби.

Кількість МДА розраховували, за формулою, використовуючи вказаний вище коефіцієнт молярної екстинції.

$$[MДА] = \frac{E_{532}}{1,56 \times 10^5 \times C_{білка}}$$

де E_{532} – оптична щільність дослідної проби; $1,56 \cdot 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ – молярний коефіцієнт триметинового комплексу; $C_{білка}$ – концентрація білка в

пробі.

Отриманий результат виражали в мкмоль/мг білка.

3.24. Визначення вмісту шифових основ та дієнових кон'югатів у печінці та нирках щурів

Даний метод базується на тому, що в процесі пероксидного окиснення на стадії утворення вільних радикалів в молекулах поліненасичених вищих жирних кислот виникає система спряження подвійних зв'язків, що підтверджується виникненням нового максимуму в спектрі поглинання при довжині хвилі 233 нм [235].

До 0,2 мл гомогенату додавали 4,8 мл суміші для екстрагування та переносили в гомогенізатор зі слабко притертим тефлоновим поршнем. Після гомогенізації проби переносили у пробірки для центрифугування, щільно закривали пробками, щоб уникнути випаровування рідини, та центрифугували при 800 g впродовж 15 хв. Надосадову рідину переносили в інші пробірки, до яких додавали 0,5 мл дистильованої води. Вміст пробірок енергійно струшували та залишали на 30 хв для розшарування фаз.

Вміст шифових основ визначали у верхній гептановій фазі та виражали в ум.од. на мг білка. Виміри проводили на флуориметрі при довжині хвилі збудження 360 нм та емісії 420 нм проти «нульової проби», що містила 2 мл верхньої гептанової фази екстрагуючої суміші без білка.

Для визначення вмісту дієнових кон'югатів до 0,5 мл верхньої гептанової фази додавали 2 мл 96% етилового спирту, проби перемішували. Значення оптичної густини вимірювали при довжині хвилі 233 нм проти «нульової проби», що містила 0,5 мл верхньої гептанової фази без білка та 2 мл 96% етилового спирту. Вміст дієнових кон'югатів розраховували згідно формули:

$$C = \frac{E * 1000 * V}{220 * a} ,$$

де E – оптична щільність дослідної проби; 220 – коефіцієнт молярної екстинції для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот; V – об'єм проби, мл; a – концентрація білка у пробі, мг; 1000 – коефіцієнт перерахунку.

3.25. Визначення супероксиддисмутазної активності у печінці та нирках щурів

Для вимірювання супероксиддисмутазної (СОД, КФ 1.15.1.1) активності було обрано метод, який базується на здатності ферменту інгібувати процес аутоокиснення адреналіну [236].

Аліквоту досліджуваних зразків (гомогенат печінки, нирок) об'ємом 10 мкл поміщали в лунки мікропланшети, в які також вносили 200 мкл 0,2 М бікарбонатного буферу, (рН 10,65). Реакцію запускали шляхом додавання в лунки 10 мкл 0,1% розчину адреналіну. В контрольну пробу не вносили джерело ферментативного білка. Величину оптичної густини вимірювали на мікропланшетному рідері при довжині хвилі 347 нм на 4-ту та 8-му хв від моменту внесення адреналіну.

Класичне вимірювання ферментативної активності за накопиченням кількості продукту або зменшенням кількості субстрату є недоступним у випадку СОД, оскільки неможливо побудувати калібрувальний графік для продукту реакції – окисненої форми адреналіну. Активність ферменту виражали в ум. од./хв*мг білка, які обраховували за формулою:

$$A = \frac{X * 50}{Y * 4 * 100 * a} ,$$

де X – оптична щільність контрольних проб без дослідного зразка, що дорівнює різниці між оптичною щільністю проби на 8-му хв та оптичної щільності проби на 4-ту хв; Y – оптична щільність проб з дослідним зразком, що дорівнює різниці між оптичною щільністю проби на 8-му хв та оптичної щільності проби на 4-ту хв; a – кількість білку в пробі, мг; 4 – період інкубації між визначенням екстинції, 4 хв; 50/100 — перерахунок в умовні одиниці.

3.26. Визначення каталазної активності у печінці та нирках щурів

Для визначення каталазної (КФ 1.11.1.6) активності застосовували спектрофотометричний метод, який базується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [237].

Під час дослідження у лунки мікропланшету вносили 200 мкл 0,03% розчину пероксиду водню. Реакцію запускали додаванням в лунки 10 мкл досліджуваного зразку. Реакцію зупиняли через 10 хв, додаючи в реакційне середовище 100 мкл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм проти контрольної проби, в яку замість проби вносили 10 мкл води.

Каталазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{E_1 - E_2}{k * t} ,$$

де A – активність ферменту, мкмоль H_2O_2 /хв*мг білка; E_1 – оптична щільність проби на початку інкубації; E_2 – оптична щільність проби в кінці інкубації; k – калібрувальний коефіцієнт; t – час інкубації.

3.27. Визначення глутатіонпероксидазної активності у печінці та нирках щурів

Глутатіонпероксидазну активність визначали за методикою, яка ґрунтується на взаємодії SH-груп відновленого глутатіону з 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою (ДТНБ), що призводить до утворення кольорового продукту реакції 2-нітро-5-тіобензоату, кількість якого прямопропорційна кількості SH-груп з максимумом поглинання при 412 нм [238].

Безпосередньо перед початком аналізу готували реактив 1: розчин відновленого глутатіону та азиду натрію у співвідношенні 0,35 мг GSH та 0,68 г NaN_3 на 1 мл 50 мМ Трис-НСІ буферу, (рН 7,4), що містив 5 мМ ЕДТА. До аліквоти дослідної проби (концентрація білка 3 мг/мл) об'ємом 90 мкл додавали 890 мкл реактиву 1 та преінкубували при 37°C протягом 5 хв, після чого додавали 20 мкл 18 мМ H_2O_2 та інкубували точно 45 сек. Реакцію зупиняли додаванням 115 мкл 50% ТХО для осадження білків. Після центрифугування (3000 об/хв, 10 хв) відбирали 200 мкл супернатанту та змішували його з 2,45 мл 0,1 М Трис-НСІ буферу (рН 8,5) та 25 мкл розчину ДТНБ (4 г/л абсолютного метанолу). Через 7,5 хв проби фотометрували при 412 нм. В стандартну пробу замість біологічного матеріалу вносили 0,15 М фосфатний буфер (рН 7,8), ТХО вносили одразу після додавання розчину H_2O_2 . Контрольна проба (для визначення неферментативного окиснення GSH за присутності пероксиду) відрізнялась від дослідної тим, що замість біологічного матеріалу в неї вносили рівний об'єм 0,15 М фосфатного буферу (рН 7,8).

З урахуванням розведення зразку та отриманих значень оптичної щільності проб, ферментативну активність виражали в мікромолях GSH/хв*мг білка та обчислювали по формулі:

$$A = \frac{(E_1 - E_2) * 11,1 * 1,33}{E_3 * p},$$

де $E_{1, 2, 3}$ – оптична щільність проб контролю, дослідів, стандарту, відповідно; 11,11 – розв'язання зразка в ході дослідів; 1,33 – коефіцієнт для вираження активності за 1 хв; концентрація білка в реакційній суміші (мг/мл).

3.28. Визначення глутатіон-S-трансферазної активності у печінці та нирках щурів

Принцип методу базується на визначенні швидкості утворення глутатіон-S-2,4-динітробензолу у ферментативній реакції відновлення глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом. Водний розчин утвореного продукту має максимум світлопоглинання при довжині хвилі 346 нм [238].

Для визначення активності ферменту, реакційна суміш була наступного складу: 1,5 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 6,5), 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону, 100 мкг білка зразку. Отриману реакційну суміш переливали в кювету. Реакцію ініціювали внесенням в кювету 0,02 мл розчину 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу. Приріст оптичної густини реакційної суміші визначали протягом 4 хв. Вимірювання оптичної щільності проб проводили проти води при довжині хвилі 346 нм. Активність глутатіон-S-трансферази розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E * V * 1000}{9,6 * a * t},$$

де ΔE – різниця оптичної щільності проби на початку реакції і через 4 хв; V – об'єм реакційної суміші, 1000 – коефіцієнт перерахунку моль в мкмоль; $V_{пр}$.

– об'єм проби (0,01 мл), l – довжина оптичного шляху, 0,5 см; 9,6 – молярний коефіцієнт світлопоглинання утвореного продукту; t – час інкубації (4 хв).

Отримане значення перераховували на мг білка, і виражали активність глутатіон-S-трансферази в мкмоль/мг*хв.

3.29. Визначення глутатіонредуктазної активності у печінці та нирках щурів

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.8.1.7) визначали за методикою, запропонованою Власовою та ін. [238].

До складу реакційної суміші входили 2 мл 50 мМ фосфатного буферу (рН 8,0), 0,2 мл 1 мМ ЕДТА, 0,5 мл 7,5 мМ окисленого глутатіону; 0,2 мл цитозольної фракції клітин, 0,1 мл 1,2 мМ НАДФН. Активність ферменту визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм за зниженням кількості НАДФН при 37° С протягом 8 хв. Активність виражали в мікромолях НАДФН*хв*мг білка та обчислювали за формулою:

$$A = \frac{\Delta E * V}{6,22 * a * t}$$

де $\Delta E = \Delta E_1 - \Delta E_2$ – різниця оптичної щільності проби між першою та останньою хвилиною замірів; V – загальний об'єм проби, мл; 6,22 – оптична щільність 1 мкМ НАДФН в 1 мл при 340 нм; a – кількість білка, мг; t – час інкубації, хв.

3.30. Хроматографічне розділення екстракту квасолі звичайної

Для фракціонування досліджуваного екстракту нами було застосовано метод гель-фільтрації з використанням сорбента Сефадекс G-25. Об'єм колонки становив 50 см³. В якості рухомої фази було застосовано деонізовану воду з нейтральним рН, в якій також розчиняли екстракт. Швидкість потоку становила 4,5 мл/хв, концентрація зразка при нанесенні становила 50 мкг/мл. Проходження розділення контролювали спектрофотометрично в ультрафіолетовій області спектру (280 нм) за допомогою напівавтоматичної системи «Bio Logic LP» виробництва фірми «Bio Rad», США та програмного забезпечення «Bio Rad Soft», США.

3.31. Визначення концентрації білка

Кількість білка визначали за методом Бредфорд, що базується на здатності білків зв'язуватися з кумасі діамантовим синім G-250 (КДС) [239].

Для визначення концентрації білка до 20 мкл проби додавали 10 мкл 30% розчину NaOH, 70 мкл води та 2 мл робочого розчину. Для приготування 100 мл робочого розчину змішували 6 мл стокового розчину, 3 мл 95% етанолу, 6 мл 88% ортофосфорної кислоти, доводили об'єм водою до 100 мл. Стоковий розчин містив 10 мл 95% етанолу, 20 мл 88% ортофосфорної кислоти, 35 мг КДС. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 595 нм проти контрольної проби, в яку замість біологічного матеріалу вносили 20 мкл води. Концентрацію білку в досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

3.32. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерних програми «Origin Pro 7.0», «SPSS 16». Основні статистичні показники підраховували шляхом обчислення середнього арифметичного значення (M), стандартної середньої арифметичної помилки (m). Різницю показників оцінювали параметричними методами варіаційної статистики ANOVA. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стюдента (t). При цьому достовірними вважались різниці при $p < 0,05$ [240].

РОЗДІЛ 4

Результати та їх обговорення

4.1. Гіпоглікемічні властивості деяких лікарських рослин, поширених на території України, що використовуються в народній медицині для лікування цукрового діабету

Зважаючи на темпи поширення ЦД та смертельну небезпечність від його супутніх ускладнень, питання профілактики та лікування даного захворювання лишається пріоритетним у національній системі охорони здоров'я як України, так і різних країн світу [2]. Сучасні підходи до лікування ЦД спрямовані на нормалізацію патологічних процесів, що лежать в основі захворювання – зниження рівня глюкози в крові, покращення функціонування β -клітин підшлункової залози та зниження інсулінорезистентності периферичних тканин [124]. Проте, незважаючи на бурхливий розвиток досліджень проблеми ЦД, це захворювання залишається відносно недоступним для лікування, що обумовлює необхідність пошуку ефективних схем терапії, зокрема створення нових антидіабетичних препаратів [183].

До відкриття інсуліну (1922 рік) та синтетичних цукрознижувальних засобів (середина 50-х років) єдиним способом підтримки хворих на ЦД була фітотерапія, яка і на сьогодні залишається потужним додатковим засобом лікування даного захворювання та його ускладнень [211]. Фітопрепарати мають низку вагомих переваг, обумовлених тим, що вони зазвичай малотоксичні, можуть використовуватися тривалий час у поєднанні з синтетичними антидіабетичними препаратами, мають багатосторонній і м'який вплив на організм людини в цілому, а отже можуть бути призначені хворим будь-якого віку незалежно від ступеня тяжкості ЦД [196]. Доведено,

що пацієнти, які активно використовують фітотерапію, потребують нижчих доз інсуліну і синтетичних лікарських засобів. З цієї точки зору виникає інтерес дослідження механізмів антидіабетичної дії лікарських рослин. Пошук та визначення активних фітокомпонентів, які обумовлюють такий терапевтичний ефект, можуть стати підґрунтям для створення нових ефективних і водночас малотоксичних лікарських засобів.

На сьогодні відомо про понад 400 видів рослин, які мають антидіабетичні властивості, механізм дії яких пов'язаний з посиленням синтезу інсуліну та оптимізацією його дії на рівні тканин, стимуляцією процесів регенерації β -клітин, регуляцією імунних процесів, інгібуванням надмірної ліпопероксидації і нормалізацією вторинних порушень обміну речовин і гормонів [210]. Здебільшого, антидіабетична дія рослин обумовлена наявністю в них біологічно активних речовин: алкалоїдів, ефірних олій, вітамінів, макро- і мікроелементів, фітогормонів. Варто відзначити, що велика кількість лікарських рослин виявляє полівалентну дію за рахунок присутності кількох діючих факторів, що забезпечує одночасний фармакологічний вплив на кілька патогенетичних ланок захворювання і дозволяє швидше досягнути бажаного результату у його лікуванні [210-216].

Нами було проаналізовано літературні дані щодо застосування лікарських рослин України для лікування ЦД та профілактики його вторинних ускладнень. Як з'ясувалося, до складу офіційних антидіабетичних зборів найчастіше входять пагони чорниці звичайної (*Vaccinium myrtillus*), лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), наземна частина кропиви дводомної (*Urtica dioica*) та суниці лісової (*Fragaria vesca*). Нами було відмічено ще два представники вітчизняної флори: часник посівний (*Allium sativum*) та розторопша плямиста (*Silybum marianum*), які мають широкий спектр терапевтичних властивостей і є популярними серед хворого на ЦД населення України. Зважаючи на те, що вищезазначені рослини можуть бути потенційною сировиною для пошуку та розробки нових антидіабетичних агентів природного походження, нами було

досліджено антигіперглікемічні властивості їх водних екстрактів в експериментах *in vivo* на здорових щурах за допомогою перорального тесту толерантності до глюкози, який окрім діагностики ЦД, є показовим також при оцінці ефективності цукрознижуючих препаратів і може бути застосований для скринінгу нових агентів з гіпоглікемічними властивостями [223].

Тест проводили на здорових статевозрілих щурах. На початку експерименту в них визначали базальний рівень глюкози в крові натще, після чого тваринам за допомогою шлункового зонду вводили екстракти досліджуваних рослин з розрахунку 10 мл/кг. Контрольну групу склали щури, які замість екстракту отримували деонізовану воду. Через 30 хв після введення досліджуваних екстрактів щурам подібним чином вводили водний розчин глюкози у дозі 3 г/кг. Рівень глікемії перевіряли через кожні 30 хв протягом наступних двох годин експерименту.

При проведенні тесту встановлено, що максимальне підвищення концентрації глюкози в крові тварин контрольної групи спостерігалось через 30 хв після глюкозного навантаження (рис. 4.1.1). Як видно з представленої глікемічної кривої, показник глікемії на 60 хв експерименту майже в два рази перевищував показник базальної концентрації та зберігався на відносно високому рівні протягом наступних 30 хв, після чого поступово знижувався. Через дві години від моменту введення глюкози її концентрація у крові тварин контрольної групи залишалася вищою на 25% відносно базального рівня.

Як видно з результатів, представлених на рисунку 4.1.1, водні екстракти ні кропиви дводомної (*U. dioica*), ані чорниці звичайної (*V. myrtillus*) не чинили помітного ефекту на динаміку зміни концентрації глюкози у ході проведеного тесту. Глікемічні криві, які відображають ефекти екстрактів даних рослин, не відрізнялись суттєво від глікемічної кривої контрольної групи: зростання концентрації глюкози на 40% через 30 хв після глюкозного

навантаження, збереження відносно високого рівня протягом наступних 30 хв та подальше поступове зниження рівня глікемії.

У групі тварин, які отримували екстракт розторопші плямистої (*S. marianum*), спостерігали прогресуюче зростання концентрації глюкози; максимальних значень показник глікемії сягав через 60 хв від моменту глюкозного навантаження і залишався на достовірно високому рівні, порівняно з показниками контрольної групи, до кінця експерименту.

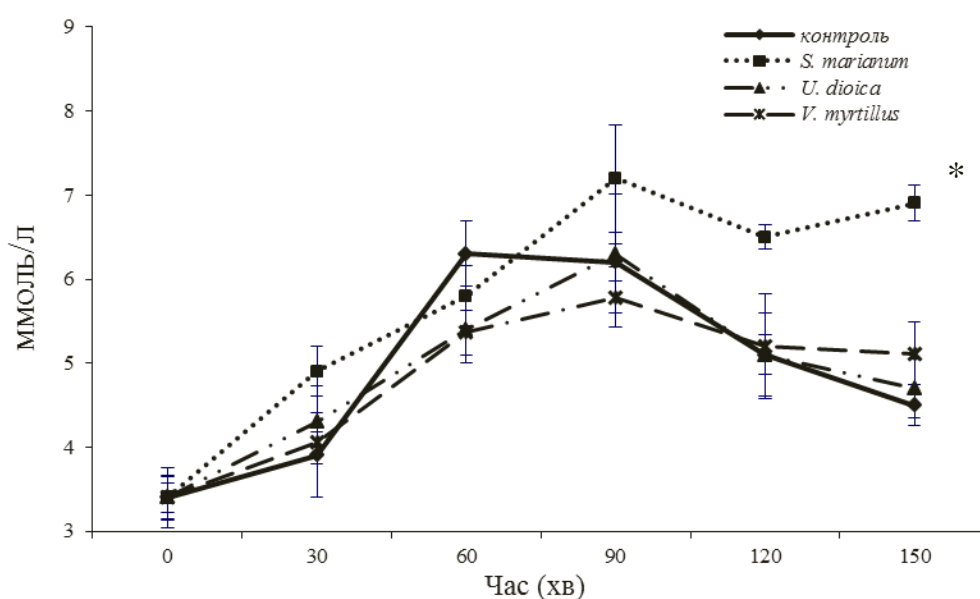


Рис. 4.1.1. Глікемічні криві, отримані в ході глюкозотолерантного тесту на фоні однократного введення дослідним тваринам водних екстрактів розторопші плямистої (*S. marianum*), кропиви дводомної (*U. dioica*) та чорниці звичайної (*V. myrtillus*), $M \pm m$, $n=6$

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Глікемічні криві, наведені на рисунку 4.1.2, демонструють, що водні екстракти часнику посівного (*A. sativum*), суниці лісової (*F. vesca*) та квасолі звичайної (*P. vulgaris*) виявляли значну антигіперглікемічну дію за умов

тесту толерантності до глюкози. Показано, що на 60 та 90 хв експерименту концентрація глюкози у крові щурів, які отримували відповідні екстракти, була нижчою на 20-40% порівняно з показниками глікемії щурів контрольної групи на тих же часових інтервалах. Натомість, на більш пізніх термінах тесту концентрація глюкози у крові тварин цих трьох груп знаходилася в межах контрольних значень.

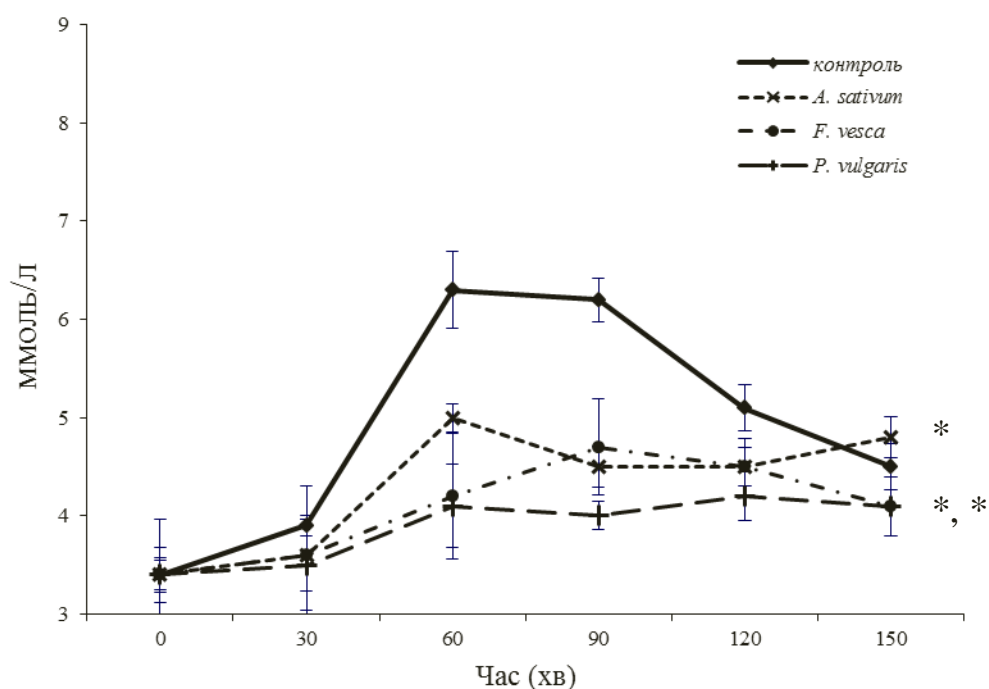


Рис. 4.1.2. Глікемічні криві, отримані в ході глюкозотолерантного тесту на фоні однократного введення дослідним тваринам водних екстрактів часнику посівного (*A. sativum*), суниці лісової (*F. vesca*) та квасолі звичайної (*P. vulgaris*), $M \pm m$, $n=6$

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Аналізуючи результати, отримані у ході проведеного тесту толерантності до глюкози встановлено, що за даних умов найбільш виражену антигіперглікемічну дію мав водний екстракт лушпиння бобів *P. vulgaris*.

Квасоля звичайна відома у народній медицині як ефективний антидіабетичний засіб. Науковий інтерес до терапевтичного потенціалу *P. vulgaris* зумовлений результатами численних досліджень, які свідчать гіпоглікемічні ефекти витяжок листя та бобів квасолі на різних тваринних моделях, а також позитивний вплив цих екстрактів на контроль апетиту та маси тіла.

Серед хворого на ЦД населення України одним з найбільш популярних народних засобів є настій лушпиння бобів квасолі звичайної. Звертає на себе увагу відсутність інформації щодо науково обгрунтованих механізмів дії цієї сировини у сучасній вітчизняній науковій літературі. Натомість у закордонних джерелах зустрічаються лише поодинокі дослідження гіпоглікемічних та антиоксидантних властивостей лушпиння бобів *P. vulgaris*. Існують також і суперечливі факти щодо цукрознижувальних властивостей цієї рослинної сировини. Так, при проведенні тесту на толерантність до глюкози на мишах не було виявлено гіпоглікемічного ефекту водного екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

Відсутність конкретної інформації щодо механізмів дії лушпиння бобів *P. vulgaris*, а також той факт, що саме ця рослинна сировина є одним з найбільш популярних народних засобів у лікуванні ЦД серед населення України, спонукало нас до більш детального вивчення її ефектів.

З метою точного розрахунку дози екстракту лушпиння *P. vulgaris* в подальших дослідженнях його біологічної дії за допомогою ліофільного висушування нами було отримано сухий екстракт, який готували, як описано в розділі 3.4, та зберігали при -20°C .

Антигіперглікемічну дію отриманого сухого екстракту порівнювали з властивостями свіжоприготовленого настою лушпиння *P. vulgaris* (рис. 4.1.3). З цією метою було проведено тест толерантності до глюкози на здорових білих нелінійних щурах.

Дію сухого екстракту вивчали у вигляді водного розчину в дозі 200 мг/кг, яка найбільш часто застосовується при дослідженні

антидіабетичних ефектів фітоекстрактів на щурах, в тому числі й серед рослинної сировини квасолі. Свіжоприготований екстракт – 10 % (в/о) водний відвар лущиння *P. vulgaris*, вводили щурам з розрахунку 10 мл/кг маси тіла тварини. Контрольні тварини за тих же умов внутрішньошлунково отримували воду.

На початку експерименту у щурів визначали рівень базальної глікемії натще, після чого їм *per os* вводили досліджувані екстракти/воду. Через 30 хв тварини *per os* отримували водний розчин глюкози у дозі 3 г/кг.

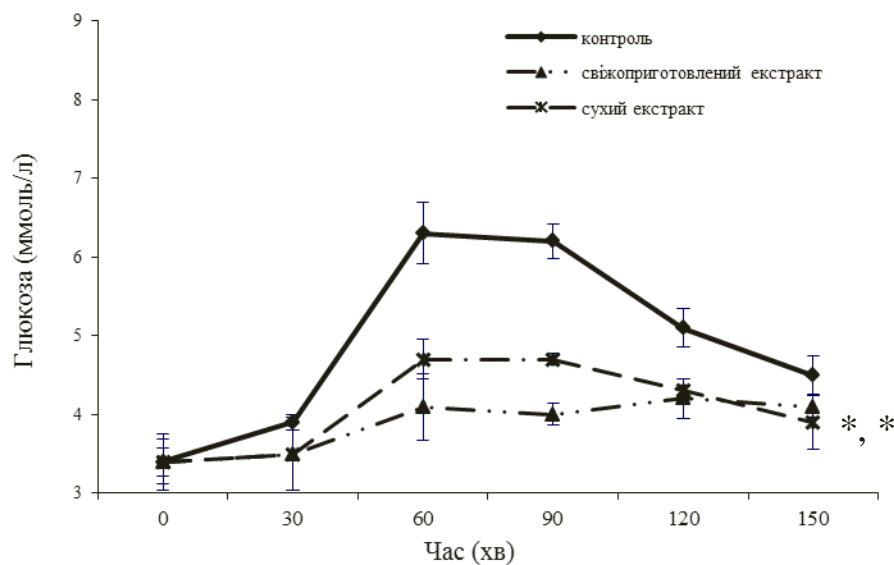


Рис. 4.1.3. Глікемічні криві, отримані в ході глюкозотолерантного тесту на фоні однократного введення дослідним тваринам свіжоприготованого екстракту та водного розчину сухого екстракту *P. vulgaris*, $M \pm m$, $n=6$

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

За допомогою результатів глюкозотолерантного тесту доведено, що антигіперглікемічні властивості ліофільно висушеного екстракту лущиння *P. vulgaris* зберігаються (рис. 4.1.3).

Широке використання лущиння *P. vulgaris* в народній медицині при лікуванні ЦД, а також отримані нами попередні результати щодо

антигіперглікемічних ефектів його водного екстракту спонукало нас до проведення всебічного вивчення антидіабетичних властивостей цієї рослинної сировини з метою встановлення механізмів дії її фітокомпонентів, подальшого одержання біологічних активних речовин та створення на їх основі лікарських засобів.

Не зважаючи на позитивні ефекти, нерідко терапія з використанням фітозасобів супроводжується супутніми, інколи, на жаль, небажаними реакціями з боку організму, які неодмінно слід враховувати при виборі лікування. Тому дослідження параметрів гострої токсичності є першим етапом щодо визначення небезпечності досліджуваної сировини в умовах короткотривалої дії та в результаті проведення якого отримують інформацію про летальні дози [217].

Вивчення гострої токсичності екстракту лушпиння *P. vulgaris* проведено на здорових білих нелінійних самцях щурів вагою 220-300 г. Усі піддослідні тварини утримувались в стандартних санітарних умовах віварію. Під час експерименту тварини знаходились при температурі 19-24°C, вологості не більше 50%, природному світловому режимі «день-ніч» у пластикових клітках, на збалансованому харчовому раціоні. Перед проведенням експерименту тварини пройшли акліматизацію в умовах кімнати для проведення досліджень протягом 7 діб. Сухий екстракт лушпиння *P. vulgaris* розчиняли у дистильованій воді та вивчали його токсичність при однократному пероральному введенні у дозах 200 мг/кг, 1 г/кг та 2 г/кг. Щури контрольної групи замість екстракту отримували воду. Дослідження з використанням широкого діапазону доз дає можливість виявити токсичні ефекти різного ступеню важкості та навіть відомості про летальні випадки. За станом дослідних тварин спостерігали протягом 14 діб від моменту введення відповідних доз екстракту. Частину тварин кожної групи (відбирали рандомізовано) виводили з експерименту через 4 години, 1 добу та 14 діб, з метою проведення біохімічних та морфологічних досліджень. Показано, що після одноразового введення екстракту *P. vulgaris*, навіть за умов його

найвищої досліджуваної дози (2 г/кг), у щурів не спостерігали ознак інтоксикації, як в день введення екстракту, так і протягом наступних 14 діб. Тварини, які отримували різні дози екстракту, не відрізнялися за своєю поведінкою та зовнішнім виглядом від щурів, які замість екстракту отримували воду. Щури були активними, реагували на світлові подразники, порушення дихання та судом не спостерігалось, стан шерстяного покриву залишався без змін. У всіх експериментальних групах тварин, які отримували різні дози екстракту, не спостерігалось змін у споживанні корму та води. Не було відмічено також летальних випадків у ході проведеного експерименту. Визначення ЛД50 для щурів не видається можливим. Подальше збільшення дози екстракту недоцільне у зв'язку з відсутністю токсичності в дозі 2 г/кг та зі складністю введення великої кількості екстракту.

Зважаючи на те, що наслідком дії екзогенних сполук та препаратів частіше всього є зміна метаболічного навантаження таких органів, як печінка та нирки, як один з критеріїв оцінки токсичної дії екстракту *P. vulgaris* ми ретельно вивчили стан саме цих внутрішніх органів: зовнішній вигляд, масу, сироваткові біохімічні маркери. Показано, що маса як печінки, так і нирок у щурів, які одноразово отримували різні дози екстракту, не відрізнялася від маси органів тварин контрольної групи на всіх термінах експерименту (табл. 4.1.1).

Таблиця 4.1.1.

**Відносна маса печінки та нирок (г/100 г маси тіла) щурів на фоні
однократного введення екстракту *P. vulgaris*; $M \pm m$, n=6**

Група тварин	печінка			нирки		
	4 години	1 доба	14 доба	4 години	1 доба	14 доба
контроль	3,04 ± 0,60	3,32 ± 0,33	4,05 ± 0,26	0,56 ± 0,08	0,59 ± 0,07	0,59 ± 0,04
200 мг/кг	3,64 ± 0,62	3,42 ± 0,15	3,45 ± 0,36	0,63 ± 0,05	0,60 ± 0,07	0,61 ± 0,06
1 г/кг	3,07 ± 0,23	3,45 ± 0,42	4,40 ± 0,30	0,62 ± 0,03	0,58 ± 0,05	0,63 ± 0,04
2 г/кг	3,09 ± 0,15	3,36 ± 0,27	3,44 ± 0,34	0,57 ± 0,05	0,60 ± 0,06	0,61 ± 0,05

* – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою щурів, які отримували воду

При патолого-анатомічному розтині дослідних тварин встановлено, що за розміром, кольором та консистенцією тканин, печінка та нирки не відрізнялися від органів контрольних щурів.

В клініці найбільш інформативним тестом щодо виявлення токсичних ефектів екзогенних препаратів, у тому числі рослинного походження, є визначення сироваткових маркерів. Нами було досліджено ключові біохімічні показники сироватки крові щурів, які отримували різні дози екстракту, на різних термінах експерименту. Змін біохімічних показників сироватки крові в межах усіх дослідних груп щурів не спостерігалось. Встановлені результати вказують на відсутність гепато- та нефротоксичних ефектів екстракту лущиння *P. vulgaris* у досліджуваних дозах за умов його одноразового введення (табл. 4.1.2.).

Грунтуючись на отриманих результатах, можна зробити висновок про нешкідливість екстракту лущиння *P. vulgaris* та його належності до 4 класу небезпеки.

Отже, в ході проведених досліджень було показано, що серед досліджуваних рослин найбільш виражену антигіперглікемічну дію виявляє водний екстракт стулок бобів квасолі звичайної. Властивості ліофільно висушеного екстракту *P. vulgaris* зберігаються. Більш того, отримані результати переконали нас у відсутності токсичних ефектів водного екстракту лущиння *P. vulgaris* навіть при найвищій досліджуваній дозі 2 г/кг.

Таблиця 4.1.2.

Біохімічні показники сироватки крові щурів на фоні однократного введення екстракту *P. vulgaris*; $M \pm m$, $n=6$

Час	4 години				1 доба				14 діб			
	Контроль	200 мг/кг	1 мг/кг	2 мг/кг	Контроль	200 мг/кг	1 мг/кг	2 мг/кг	Контроль	200 мг/кг	1 мг/кг	2 мг/кг
Заг. білок (мг/л)	68,8±7,4	74,0±4,5	65,2±4,1	66,4±4,0	83,6±8,2	77,7±0,5	78,3±2,4	74,4±4,3	70,0±8,2	58,2±4,3	64,4±2,8	68,0±1,5
Альбумін (мг/л)	35,4±3,4	37,7±3,4	33,7±2,0	35,8±1,1	41,7±3,4	40,1±1,1	40,2±1,1	38,1±1,0	37,8±3,4	25,0±0,8	31,2±4,6	32,6±1,9
Заг. білірубін (мкмоль/л)	2,3±0,7	2,0±0,4	1,5±0,4	1,7±0,5	1,9±0,7	2,5±0,7	2,6±0,2	1,5±0,3	1,0±0,7	1,7±0,3	2,2±0,7	1,6±0,3
Пр. білірубін (мкмоль/л)	0,6±0,1	0,9±0,2	0,7±0,2	0,9±0,1	0,7±0,1	1,1±0,4	1,0±0,1	0,7±0,2	0,6±0,1	0,8±0,2	0,9±0,2	0,8±0,1
АЛТ (од/л)	74,5±3,3	81,2±5,3	63,9±6,8	60,1±7,6	71,1±3,1	98,8±18,0	74,2±1,9	58,0±13,0	68,1±3,1	85,3±17,1	91,9±7,8	73,7±4,1
АСТ (од/л)	246,7±34,1	228,0±36,7	208,2±33,9	191,2±21,4	179,4±45,1	215,0±16,6	180,3±21,5	173,9±10,9	195,7±45,1	244,1±51,1	250,4±43,2	235,5±25,5
ГГТ (од/л)	3,9±3,0	3,0±0,6	2,3±1,2	2,4±0,7	2,4±1,0	4,7±0,3*	2,5±0,3	2,9±1,2	4,2±1,0	4,0±0,9	3,3±0,5	1,8±0,2
ЛФ (од/л)	365,7±61,5	522,0±45,5	634,1±48,6	398,7±66,8	440,3±58,5	736,8±71,5	384,5±42,4	450,3±38,5	429,0±58,5	770,3±112,7	881,2±96,7	672,6±47,6
Амілаза (од/л)	796,7±66,3	717,2±98,7	701,3±71,2	681,3±15,1	679,1±29,4	667,5±47,7	688,4±14,0	621,6±30,0	796,7±56,3	704,8±18,8	767,8±78,7	587,0±10,6
Глюкоза (ммоль/л)	6,9±0,6	6,7±0,3	5,6±0,4	6,0±0,3	6,5±0,6	6,9±0,6	6,8±0,1	6,3±0,3	5,89±0,6	4,9±0,1	4,8±1,3	6,3±0,1
Сечовина (ммоль/л)	6,4±1,5	4,7±0,3	4,4±0,3	4,3±0,6	6,4±1,5	4,6±0,4	4,0±0,3	5,2±0,8	6,4±1,5	4,9±0,4	5,9±0,8	4,2±0,2
Креатинін (мкмоль/л)	56,8±5,3	62,3±7,3	56,4±4,7	53,8±5,2	56,8±5,3	54,3±4,2	52,3±1,2	54,3±3,0	56,8±5,3	55,5±2,8	57,1±4,1	57,6±1,8
Заг. холестерин (ммоль/л)	1,8±0,2	1,8±0,1	1,6±0,1	1,6±0,4	1,8±0,2	1,8±0,0	1,7±0,5	1,8±0,3	1,8±0,2	1,6±0,1	2,1±0,1	1,6±0,2
K ⁺ (ммоль/л)	6,8±0,5	7,0±0,2	6,9±0,1	6,6±0,9	6,8±0,5	6,3±0,4	6,0±0,2	6,4±0,3	6,8±0,5	6,5±0,4	6,2±0,6	6,1±0,3
Na ⁺ (ммоль/л)	143,3±1,5	147,0±2,0	144,7±0,6	140,3±3,5	143,3±1,5	142,3±1,5	145,0±1,0	143,7±1,5	143,3±1,5	142,0±2,0	142,3±1,5	145,0±1,7
Ca ²⁺ (ммоль/л)	0,8±0,08	1,1±0,1	1,1±0,1	0,8±0,1	0,8±0,05	0,9±0,07	0,9±0,06	0,8±0,1	0,8±0,04	0,8±0,1	0,9±0,1	0,9±0,05
СГ (ммоль/л)	106,3±1,5	106,7±0,6	107,0±1,7	104,7±3,5	106,3±1,5	105,7±0,6	105,3±1,5	104,7±1,2	106,3±1,5	104,3±1,5	104,3±1,2	105,0±1,0

* – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою щурів, які отримували воду

Означені ефекти стали підґрунтям для подальших більш конструктивних досліджень антидіабетичних властивостей екстракту лущиння *P. vulgaris*.

4.2. Гіпоглікемічні властивості екстракту *P. vulgaris* за умов експериментального цукрового діабету 1 типу у щурів

Наступним етапом нашої роботи було дослідження гіпоглікемічного ефекту екстракту *P. vulgaris* в дозі 200 мг/кг. Екстракт вводили внутрішньошлунково у вигляді водного розчину контрольним щурам та тваринам з моделлю стрептозотоцин-індукованого ЦД 1 типу. Схему проведеного експерименту наведено нижче.



Нами було досліджено ефект однократного (1 доба) та довготривалого (28 діб) введення екстракту *P. vulgaris* щурам з моделлю ЦД: проведено тест на толерантність до глюкози та досліджено утилізацію глюкози клітинами гемідіафрагми дослідних щурів. Результати глюкозотолерантного тесту відображені на рисунку 4.2.1.

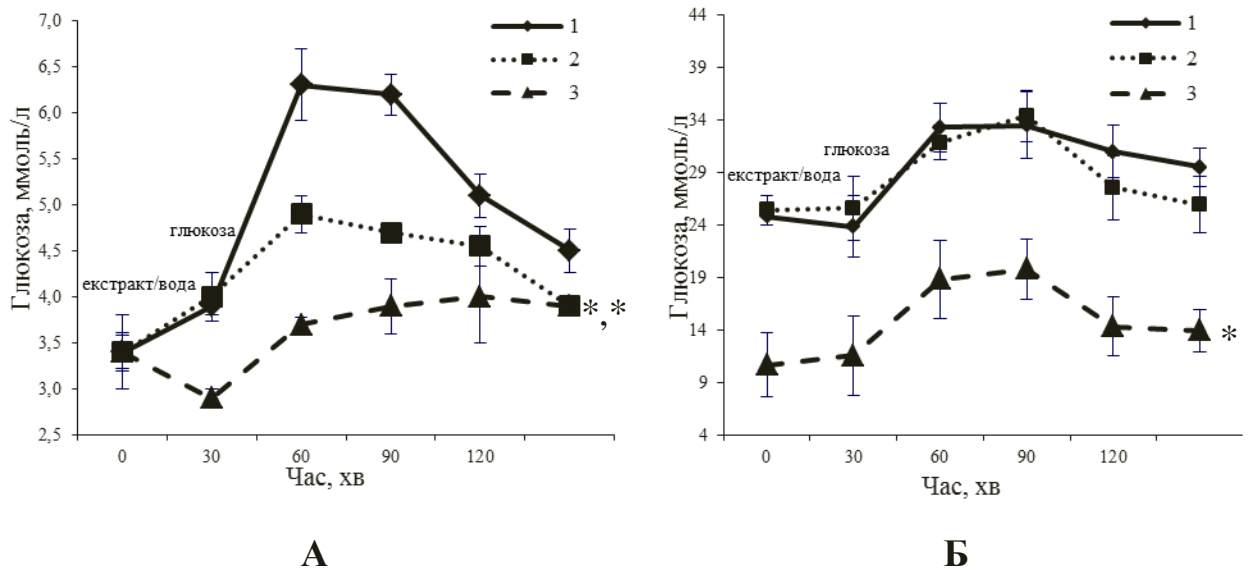


Рис. 4.2.1. Глікемічні криві, отримані в ході глюкозотолерантного тесту на фоні однократного (1 доба) та довготривалого (28 діб) введення екстракту *P. vulgaris* (200 мг/кг) контрольним щурам (А) та щурам з ЦД 1 типу (Б); $M \pm m$, $n=10$:

1 – тварини, які отримували воду; 2 – тварини, які отримували екстракт однократно; 3 – тварини, які отримували екстракт впродовж 28 діб

* – $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою тварин, які замість екстракту отримували воду

Встановлено, що екстракт *P. vulgaris* чинив антигіперглікемічну дію за умов його як однократного, так і довготривалого введення контрольним щурам (рис. 4.2.1 А). Так, у групі контрольних тварин, які одноразово отримували екстракт, концентрація глюкози в крові на 60-ту та 90-ту хв тесту була на 22-24 % нижчою, порівняно з максимальними значеннями глікемії в такий же момент часу групи контрольних щурів, що замість екстракту отримували воду. В той час як у групі контрольних тварин, які отримували екстракт протягом 28 діб, концентрація глюкози на даному часовому інтервалі в ході глюкозотолерантного тесту була на 40-37 % нижчою,

порівняно зі значенням групи контрольних щурів, що замість екстракту отримували воду (рис. 4.2.1 А).

Однократне введення екстракту щурам з моделлю ЦД 1 типу не впливало на толерантність тканин до глюкози. При його довготривалому введенні спостерігали значне зниження як базального рівня глікемії – 10,7 мМ проти 25,5 мМ у групі щурів з ЦД, які замість екстракту отримували воду, так і підвищення глюкозотолерантності тканин щурів даної групи (рис. 4.2.1 Б).

Зниження показників глікемії у динаміці глюкозотолерантного тесту у щурів, які отримували екстракт *P. vulgaris*, може бути наслідком інгібуючої дії фітокомпонентів лушпиння квасолі на процес засвоєння глюкози ендотелієм кишечника, а також результатом позитивного впливу на інсулінозалежні процеси утилізації глюкози клітинами периферичних тканин (м'язи, жирова, печінка).

Згідно літературних даних боби *P. vulgaris* є джерелом інгібіторів α -амілазної активності. Зокрема відомо про наявність щонайменше трьох ізоформ інгібіторів α -амілази: α -A1, α -A12, α -A1L, які містяться у сім'ядолях бобів квасолі та попереджують гідроліз крохмалю рослинними α -амілазами. Було показано, що ізоформа α -A1 інгібує активність α -амілази в організмі людини, сповільнюючи засвоєння крохмалю, а отже – зниження рівня постпрандіальної глікемії. Однак в науковій літературі відсутня інформація щодо питань: чи пов'язана антидіабетична дія квасолі звичайної з присутністю серед її фітокомпонентів активних речовин з інсуліно-міметичною природою; речовин, які можуть безпосередньо впливати на вуглеводний обмін через регуляцію внутрішньоклітинних гормон-залежних процесів та, як наслідок, – знижувати рівень глікемії. Більш того, на сьогодні є недослідженим вплив такої рослинної сировини як лушпиння *P. vulgaris* на вищезазначені процеси. Пошук саме таких речовин рослинного походження є перспективним напрямком у створенні нових низькотоксичних

антидіабетичних засобів, які до того ж чинять м'який терапевтичний вплив на кілька патогенетичних ланок розвитку ЦД.

Одним із доступних та наочних способів оцінки ефекту екстракту лушпиння *P. vulgaris* на інсулінозалежні процеси є дослідження утилізації глюкози ізольованою гемідіафрагмою, посмугованим м'язом черевної порожнини, яка є тканиною-мішенню інсуліну. Вивчення даного параметру здійснювали в експериментах *in vitro*. У дослідних щурів (схема експерименту наведена вище) вилучали гемідіафрагму та поміщали в поживне середовище, яке містило відому концентрацію глюкози та інкубували протягом 2 год при 37°C та постійній аерації середовища (детальніше – у розділі 3.16.). Концентрацію глюкози в середовищі визначали на початку та в кінці інкубації глюкооксидазним методом.

Встановлено, що у щурів з ЦД 1 типу рівень засвоєння глюкози гемідіафрагмою не відрізнявся від контрольних показників. Такі дані можуть бути обумовлені тим, що розвиток гіперглікемії за умов моделі СТЗ-індукованого діабету обумовлений в першу чергу ушкодженням інсулінопродукуючих β -клітин підшлункової залози, тоді як периферичні інсулін-залежні тканини на окремих етапах прогресування змодельованої патології зберігають здатність утилізувати глюкозу.

Показано, що однократне введення екстракту щурам як контрольної групи, так і тваринам з моделлю ЦД, не впливало на рівень поглинання глюкози їх гемідіафрагмами (рис. 4.2.2). За умов же довготривалого введення екстракту контрольним тваринам, рівень поглинання глюкози їх тканинами був більшим на 30% порівняно з групою контрольних щурів, які замість екстракту отримували воду (рис. 4.2.2 А). При довготривалому введенні екстракту діабетичним тваринам рівень поглинання глюкози гемідіафрагмою був вищим на 80 % порівняно з групою щурів з ЦД, які замість екстракту отримували воду (рис. 4.2.2 Б).

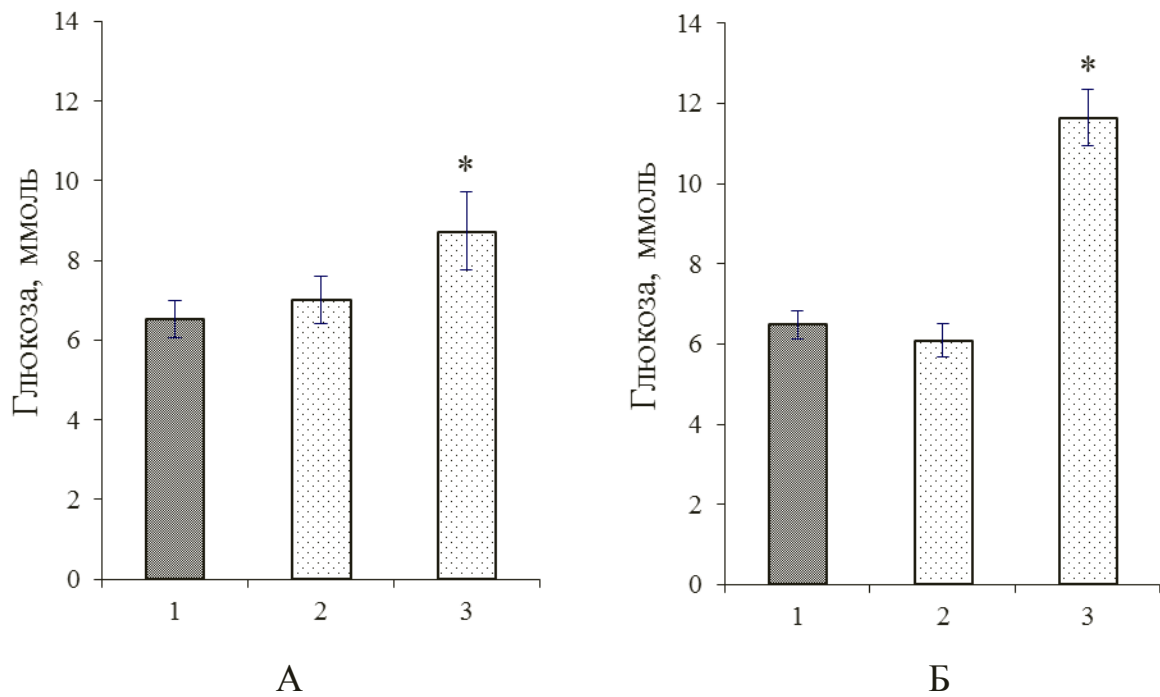


Рис. 4.2.2. Кількість глюкози, засвоєної гемідіафрагмою, на фоні однократного (1 доба) та довготривалого (28 діб) введення тваринам екстракту *P. vulgaris* (200 мг/кг) контрольним щурам (А) та щурам з ЦД 1 типу (Б); $M \pm m$, $n=10$:

1 – тварини, які отримували воду; 2 – тварини, які отримували екстракт однократно; 3 – тварини, які отримували екстракт вродовж 28 діб.

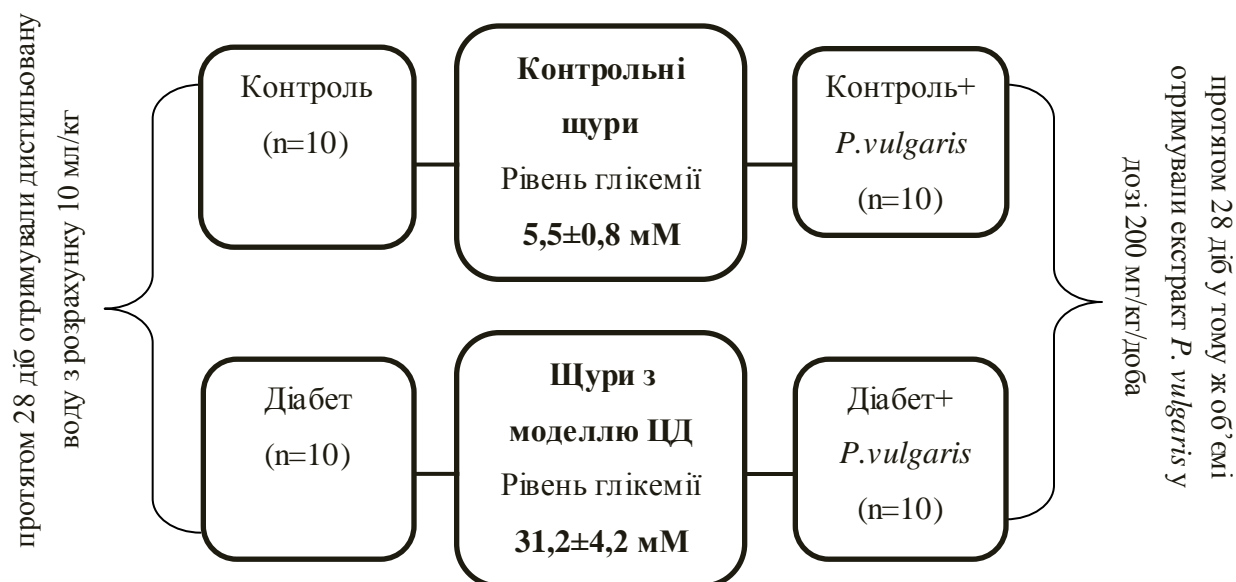
* – $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою тварин, які замість екстракту отримували воду

Отримані результати підтверджують той факт, що за умов експериментального ЦД у щурів екстракт лущиння *P. vulgaris* володіє вираженою гіпоглікемічною дією, позитивно впливає на толерантність тканин до глюкози, посилює утилізацію глюкози периферичними інсулінозалежними тканинами, однак лише при його довготривалому введенні. Можливо, це пов'язано з тим, що одноразового введення екстракту щурам з моделлю ЦД не достатньо для корекції патологічних процесів

даного стану й антидіабетичний ефект екстракту може реалізуватися лише за умов його довготривалої дії та/або достатнього накопичення активних фітокомпонентів в організмі. Тому більш детальне вивчення антидіабетичних ефектів сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* доцільно було продовжувати лише за умов довготривалого експерименту (28 діб).

4.3. Антидіабетичні властивості екстракту *P. vulgaris* за умов його довготривалого введення

Для вивчення впливу сухого екстракту лушпиння квасолі звичайної за умов його 28-денного перорального введення, усіх дослідних щурів було поділено на чотири групи, названі: «Контроль», «Контроль+*P. vulgaris*», «Діабет», «Діабет+*P. vulgaris*». Нижче наведена схему експерименту.



З огляду на те, що патологічні процеси за умов ЦД впливають практично на всі системи організму та супроводжуються вираженими симптомами у хворого, одним із завдань в ході вивчення терапевтичного ефекту екстракту

лушпиння *P. vulgaris* на моделі ЦД 1 типу у щурів було дослідити його системну дію на функціональний стан організму тварин в цілому.

4.3.1. Показники вуглеводного обміну у щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту *P.vulgaris*.

Враховуючи той факт, що маніфестантними ознаками ЦД є поліфагія та полідипсія, нами було досліджено динаміку споживання води та корму контрольними щурами та тваринами з моделлю ЦД 1 типу впродовж 28-денного введення екстракту (рис. 4.3.1.1).

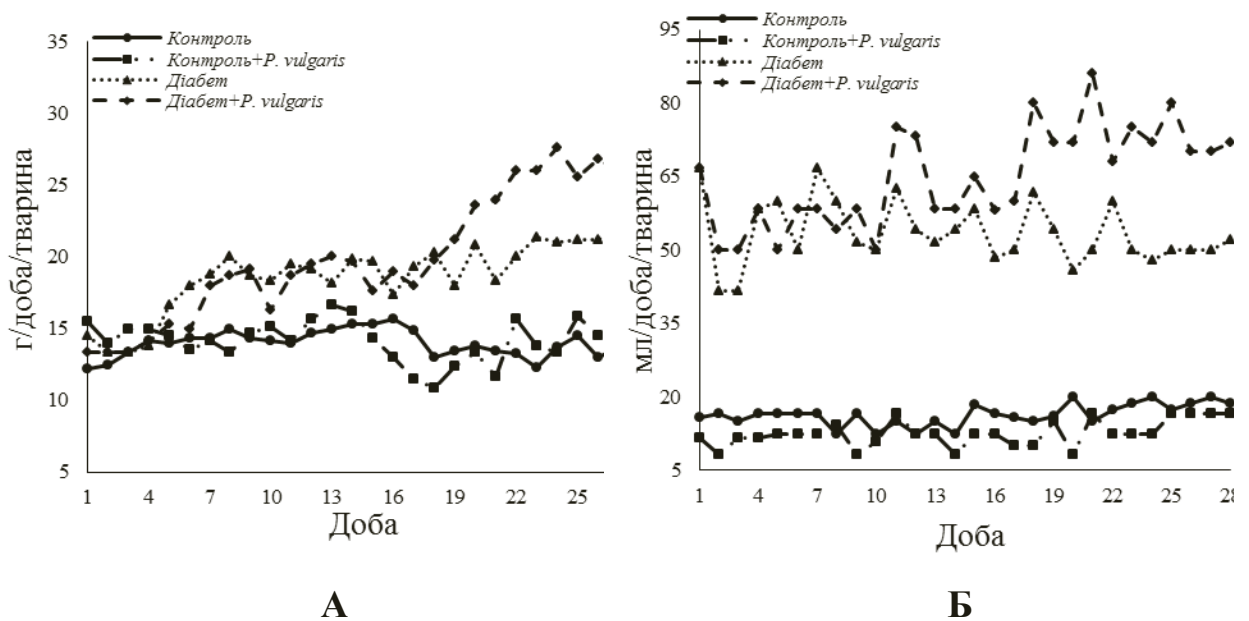


Рис. 4.3.1.1. Динаміка споживання корму (А) та води (Б) на фоні введення екстракту *P.vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

Показано, що протягом усього експерименту щури з патологією ЦД (група «Діабет») споживали більшу кількість корму та води, порівняно з тваринами групи «Контроль».

На рисунку 4.3.1.2 наведено величину цих параметрів на останньому тижні експерименту (21-28 доба). Так, рівень споживання корму в цей період у групі «Діабет» був у 1,6 раз більшим, а води у 2,7 разів порівняно з показниками групи «Контроль».

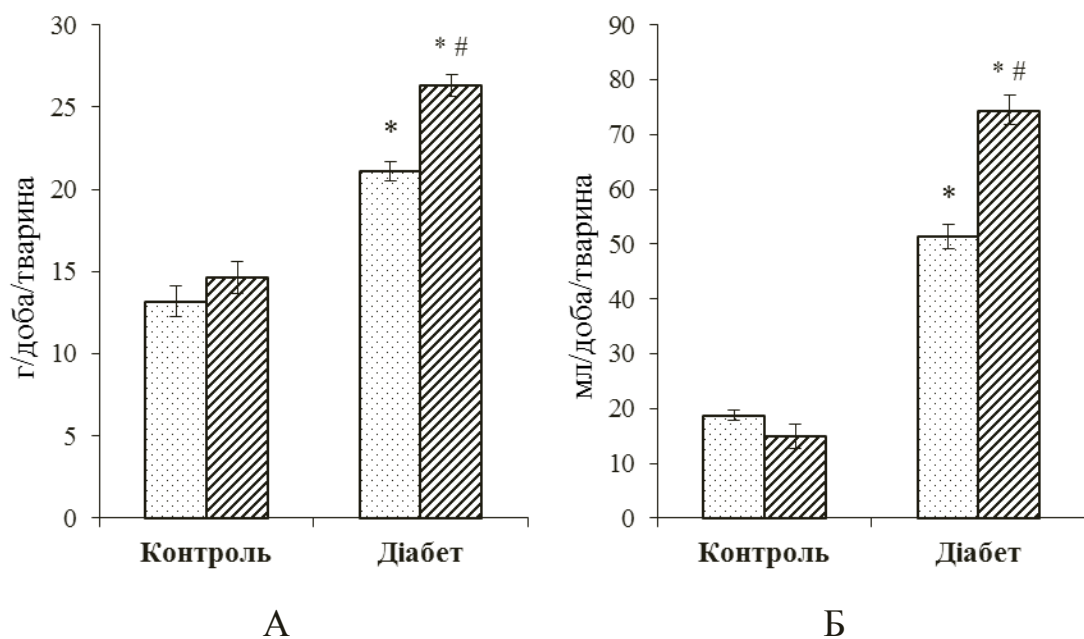


Рис. 4.3.1.2. Споживання корму (А) та води (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* протягом 21-28 доби контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

У групі тварин з моделлю ЦД 1 типу, які отримували екстракт, починаючи з 3-го тижня експерименту було відмічено збільшення обсягів

споживання води та корму відповідно на 45 та 24 %, порівняно з групою «Діабет». У групі контрольних тварин досліджуваний екстракт не впливав на вищеописані параметри.

На рисунку 4.3.1.3 наведені дані змін маси тіла щурів дослідних груп впродовж 28 днів експерименту. Показано, що щури групи «Діабет» стабільно втрачали вагу. На 28-му добу цей показник був на 20 % нижчим порівняно зі значеннями на 1-шу добу експерименту. За умов даної експериментальної патології втрата маси тіла узгоджується з клінічною картиною ЦД 1 типу, оскільки по мірі прогресування деструкції β -клітин та подальшого дефіциту інсуліну для забезпечення альтернативного джерела енергії має місце неконтрольоване збільшення ліполізу та протейнурії [241]. Натомість, у групі щурів «Контроль» показник маси тіла збільшився на 28 % на 28-му добу експерименту.

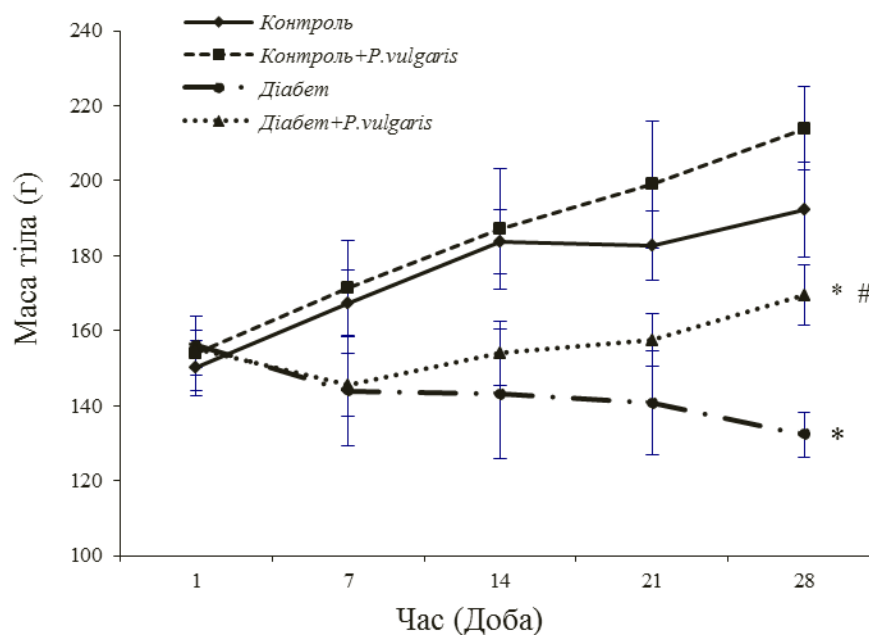


Рис. 4.3.1.3. Середня маса тіла на фоні введення екстракту *P.vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

У щурів з моделлю ЦД, які отримували екстракт *P. vulgaris*, маса тіла збільшувалась, проте не так виражено, як у групах контрольних щурів – на 10 % в кінці досліду порівняно зі значеннями на 1-шу добу. Це свідчить про те, що при введенні екстракту зменшуються прояви метаболічних порушень. У групі щурів «Контроль» показник маси тіла збільшився на 36 % на 28-му добу експерименту (див. рис. 4.3.1.3).

По закінченню 28-денного терміну введення екстракту лушпиння *P. vulgaris* у дослідних тварин усіх груп визначали рівень глікемії натще, концентрацію глікозильованого гемоглобіну в крові та інсуліну в сироватці крові. Результати досліджень представлені на рисунку 4.3.1.4.

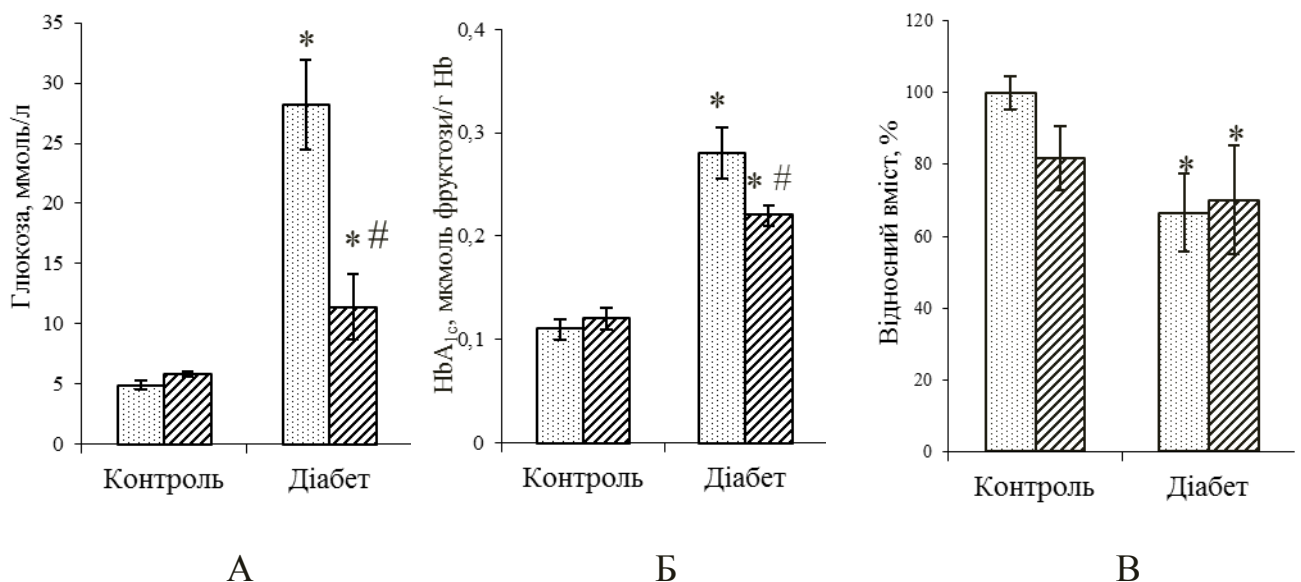


Рис. 4.3.1.4. Концентрація глюкози (А), глікозильованого гемоглобіну (Б) в крові та відносний вміст інсуліну (В) у сироватці крові на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Як показали отримані результати, екстракт лушпиння *P. vulgaris* мав виражений гіпоглікемічний ефект у щурів з моделлю ЦД. Концентрація глюкози у тварин групи «Діабет+*P. vulgaris*» була нижчою у 2,5 рази порівняно з відповідним показником у тварин групи «Діабет» (4.3.1.4 А).

Однак як видно з представлених результатів, повної нормалізації глікемії внаслідок дії екстракту в крові щурів з ЦД не відбувалося, що, у свою чергу, може пояснити підвищену концентрацію глікозильованого гемоглобіну у тварин групи «Діабет+*P. vulgaris*» (рис. 4.3.1.4 Б). Однак слід відзначити, що у групі щурів з моделлю ЦД 1 типу, які отримували екстракт, концентрація глікозильованого гемоглобіну була на 20% нижчою, ніж у крові тварин з ЦД, які отримували воду.

Загальновідомо, що з прогресуванням патологічних змін в структурно-функціональному стані β -клітин підшлункової залози внаслідок токсичного впливу стрептозотоцину порушується синтез і вивільнення інсуліну, що призводить до дисбалансу глюкозного і ліпідного гомеостазу та, як наслідок, розвитку діабету у дослідних тварин. Згідно з отриманими результатами (рис. 4.3.1.4 В), відносний вміст інсуліну в сироватці крові тварин групи «Діабет», був у 1,5 рази нижчим, ніж у групі «Контроль».

За умов вживання тваринами з ЦД екстракту *P. vulgaris* не спостерігалось нормалізації рівня інсуліну в сироватці крові. В літературі є дані про те, що екстракт *P. vulgaris* може посилювати секрецію інсуліну β -клітинами підшлункової залози [214]. Зважаючи на особливості використаної експериментальної моделі ЦД, отримані нами результати не суперечать раніше встановленим даним щодо інсулінстимулювального ефекту цієї рослини, однак можуть свідчити про відсутність репаративних властивостей її фітокомпонентів по відношенню до зруйнованих токсичною дією стрептозотоцину інсулінпродукуючих клітин підшлункової залози.

Оскільки у групі контрольних щурів вживання екстракту *P. vulgaris* суттєво не позначалося на досліджуваних показниках (рис. 4.3.1.4), отримані результати надають підставу стверджувати, що водний екстракт лушпиння

квасолі звичайної виявляє свою гіпоглікемічну дію лише за умов високої концентрації глюкози при ЦД у щурів.

Зважаючи на мультифакторність патогенезу ЦД, гіперглікемія може бути як наслідком зниження секреції інсуліну клітинами підшлункової залози, так і порушення його дії на клітини-мішені, залучені до утилізації глюкози. Більш того, не останнє місце у патогенезі ЦД належить дисбалансу компонентів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) та імунної системи, що, як відомо, є причиною розвитку мікро- та макроваскулярних ускладнень ЦД, а також ушкоджуючим фактором по відношенню до β -клітин підшлункової залози.

Тому для подальших досліджень ефектів сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* та встановлення механізму антидіабетичної дії його активних фікокомпонентів ми комплексно вивчили два питання:

- 1) дію екстракту лушпиння *P. vulgaris* на метаболічні процеси організму в цілому, регуляцію функціонування системи АОЗ та імунної системи;
- 2) дію екстракту лушпиння *P. vulgaris* на внутрішньоклітинні процеси вуглеводного обміну в периферичних тканинах-мішенях дії інсуліну.

Хронічна гіперглікемія є причиною ряду метаболічних розладів, які в свою чергу, можуть сприяти дисфункції різних органів. У нашому дослідженні увага, зокрема, була сфокусована на вивченні функціонального стану печінки і нирок за умов патології ЦД та довготривалого впливу екстракту *P. vulgaris*, оскільки саме ці органи є особливо вразливими за умов розвитку та прогресування ЦД.

Печінка є центральним органом, в якому здійснюються детоксикаційні та метаболічні процеси. Поряд з м'язовою та жировою тканиною печінка відіграє ключову роль у метаболізмі вуглеводів, тому порушення з боку цього органу можуть бути причинно-наслідковими факторами ускладнень ЦД.

Діабетична нефропатія – це неімунне дифузне прогресуюче ураження нирок, яке є тяжким проявом мікро- та макроангіопатій, що ускладнюють

перебіг ЦД. Порушення ниркових функцій значно погіршує якість життя та можливості корекції обміну речовин за умов ЦД — гіперглікемії, гіперліпідемії, судинних та інших розладів.

У таблиці 4.3.1.1 представлені дані відносної маси печінки й нирок у щурів усіх дослідних груп на 28-му добу введення екстракту. Встановлено, що групі щурів «Діабет», показник відносної маси печінки був вищим на 25%, порівняно з групою «Контроль». У групі діабетичних щурів, які отримували екстракт *P. vulgaris*, маса печінки була більшою на 20%, у порівнянні з групою діабетичних тварин, які отримували воду та, відповідно, на 40% порівняно з групою тварин «Контроль». Більш того, у групі контрольних щурів, які отримували екстракт, також спостерігалась тенденція до збільшення даного органу на 15% (див. табл. 4.3.1.1).

Таблиця 4.3.1.1.

Відносна маса печінки та нирок (г/100 г маси тіла) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу, $M \pm m$, $n=10$

Група тварин	Печінка	Нирки
Контроль	3,58±0,11	0,63±0,06
Контроль+ <i>P. vulgaris</i>	4,21±0,19*	0,79±0,05*
Діабет	4,73±0,59*	1,23±0,03*
Діабет+ <i>P. vulgaris</i>	5,89±0,37*#	1,1±0,11*

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

У ході досліджень співвідношення маси нирок до загальної маси тіла теж були відмічені певні зміни (див. табл. 4.3.1.1). У групі тварин з моделлю

ЦД 1 типу даний показник був у 2 рази більшим, порівняно з контролем. У групі діабетичних щурів, які протягом експерименту отримували екстракт, цей показник знаходився на рівні групи «Діабет». Звертає увагу те, що в усіх дослідних щурів з цією експериментальною патологією спостерігали поліурію. У групі «Контроль+*P. vulgaris*» відмічено збільшення відносної маси нирок на 20%, порівняно з групою «Контроль».

Збільшення маси печінки та нирок у групах як контрольних так і діабетичних щурів, які піддавались довготривалому впливу екстракту, може свідчити про певне метаболічне навантаження на ці органи за даних умов.

Про функціональний стан організму у щурів досліджуваних груп судили за змінами ключових біохімічних показників сироватки крові. Показано, що активність ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ), аспаратамінотрансферази (АСТ) та γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) була значно вищою у групі «Діабет» порівняно зі значеннями групи «Контроль» (табл. 4.3.1.2). Такі результати можуть свідчити про деструктивні зміни у клітинах печінки за умов досліджуваної патології, зокрема порушення цілісності клітинних мембран гепатоцитів. Концентрація креатиніну в сироватці крові щурів з моделлю ЦД була зниженою, що може бути пов'язане з порушенням функціонування печінки та нирок, адже відомо, що синтез креатину – попередника креатиніну, відбувається саме в цих органах. Концентрація сечової кислоти була збільшена в 1,4 рази, порівняно з групою контрольних щурів, що може бути сигналом про порушення ниркової функції, зокрема, екскреторної (див. табл. 4.3.1.2).

За умов довготривалого споживання екстракту лушпиння *P. vulgaris* щурами з моделлю ЦД 1 типу спостерігали нижчий рівень активності АЛТ, АСТ, ГГТ та концентрації сечової кислоти, порівняно з групою щурів «Діабет».

Таблиця 4.3.1.2.

**Біохімічні показники сироватки крові на фоні введення екстракту
P.vulgaris контрольним щурам та щурам з
ЦД 1 типу, $M \pm m$, $n=10$**

Група тварин	Контроль	Контроль+ <i>P. vulgaris</i>	Діабет	Діабет+ <i>P. vulgaris</i>
Загальний білок (мг/л)	67,15±3,0	69,68±3,72	72,15±5,16	67,57±7,3
Альбумін (мг/л)	34,1±1,87	34,85±3,73	30,4±5,7	31,13±3,31
АЛТ (од/л)	56,08±8,23	59,30±7,88	94,80±6,00*	65,13±6,09 [#]
АСТ (од/л)	182,25±15,16	200,45±28,04	347,68±9,62*	269,77±22,20* [#]
ГГТ (од/л)	4,28±0,93	2,93±0,48*	10,85±0,65*	8,07±0,38* [#]
Заг. холестерол (ммоль/л)	1,77±0,08	2,09±0,27	1,18±0,14*	1,42±0,32
ЛПВЩ (ммоль/л)	0,68±0,06	0,8±0,14	0,27±0,04*	0,39±0,06* [#]
ЛПНЩ (ммоль/л)	0,21±0,03	0,22±0,01	0,17±0,01	0,15±0,02*
Тригліцериди (ммоль/л)	0,68±0,11	0,63±0,1	0,62±0,17	0,82±0,13
Креатинін (мкмоль/л)	63,05±3,70	64,45±3,18	53,45±1,07*	50,87±3,96*
Сечова кислота (ммоль/л)	111,23±13,48	122,88±13,73	155,40±10,47*	97,53±10,89* [#]
Сечовина (ммоль/л)	7,00±0,74	6,38±1,20	8,63±1,51	15,33±3,10* [#]
K ⁺ (ммоль/л)	6,2±0,18	6,38±0,73	5,9±0,71	5,55±0,49
Na ⁺ (ммоль/л)	141,75±2,06	140,50±3,51	138,50±3,54	144,0±1,41
Ca ²⁺ (ммоль/л)	0,73±0,16	0,81±0,11	0,76±0,07	0,55±0,09
СГ (ммоль/л)	102,50±2,38	102,25±2,22	97,50±2,12	98,50±0,71

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

В той же час, концентрація креатиніну не відрізнялась статистично в межах обох дослідних груп діабетичних тварин. Концентрація сечовини була вищою в 1,4 рази у групі діабетичних тварин, які отримували екстракт (див. табл. 4.3.1.2).

У групі контрольних щурів, які отримували екстракт *P. vulgaris*, було відмічено зниження активності ГГТ у 1,5 рази, порівняно показником активності у щурів групи «Контроль». Усі інші досліджувані біохімічні показники сироватки крові не відрізнялися статистично в межах груп «Контроль» та «Контроль+*P. vulgaris*» (див. табл. 4.3.1.2).

У ході дослідження біохімічних показників ліпідного профілю у групі щурів з моделлю ЦД, які замість екстракту отримували воду, було виявлено зниження рівня загального холестеролу на 30% та ЛПВЩ на 60% порівняно з відповідним контролем. Зазначені показники є індикаторами синтетичних функцій печінки, де здійснюється їх утворення. У групі діабетичних щурів, які отримували екстракт, спостерігали підвищення рівня ЛПВЩ, порівняно з групою «Діабет» (див. табл. 4.3.1.2).

Значення вмісту електролітів, а також загального білка та альбуміну крові не відрізнялись статистично в межах усіх дослідних груп (див. табл. 4.3.1.2).

Біохімічні показники сироватки крові щурів групи «Діабет+*P. vulgaris*» свідчать про корегуючий вплив екстракту на деструктивні зміни клітин печінки та відновлення синтетичної функції даного органу у щурів з моделлю ЦД. Однак зміни біохімічних параметрів, що відображають стан ниркової функції, не є односпрямованими і можуть бути наслідком побічних ефектів екстракту лущиння квасолі звичайної. Таким чином, необхідно враховувати той факт, що поряд з гіпоглікемічною дією даний фітопрепарат впливає також на метаболічні функції нирок, тому, безумовно, доцільним є подальше більш детальне дослідження екстракту лущиння *P. vulgaris*, можливо, шляхом його очищення та виділення активних компонентів.

4.3.2. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту у печінці та нирках щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту *P. vulgaris*.

Нелікована чи недостатньо коригована гіперглікемія запускає низку метаболічних порушень: активацію процесів неферментативного глікозилювання, підвищення аутоокиснення глюкози, активацію поліолового шляху обміну глюкози, пряму глюкозотоксичність, пов'язану з активацією протеїнкінази C, яка сприяє проліферації клітин ендотелію, зокрема в капілярах нирок.

Автоокиснення глюкози шляхом утворення енендіол-таутомерних форм призводить до генерації реактивних інтермедіатів – таких, як гідроксильний і супероксидний радикали, а також кетоальдегідів та перекису водню. Означені структури реагують з органічними та неорганічними сполуками клітин. Деградація ліпідів мембрани клітини, опосередкована вільними радикалами, веде до зростання її плинності і збільшує проникність мембрани до іонів, що порушує клітинний гомеостаз у цілому.

Нагромадження в клітинах АФК при ЦД також викликає окиснювальну модифікацію білків унаслідок окиснення залишків сірковмісних амінокислот і зміни координаційної геометрії металів в активних центрах ферментів. У хворих на ЦД стан оксидантного стресу посилюється процесами неферментативного глікозилювання білків з подальшою модифікацією властивих їм функцій [50-52]. Глікозилюються гемоглобін еритроцитів, білки ліпопротеїнових комплексів, ферменти [49].

Багатьма дослідниками оксидативний стрес розглядається як ключовий момент у патогенезі ускладнень ЦД. Накопичення продуктів вільнорадикального окислення сприяє розвитку низки патологічних процесів, зокрема мітохондріальної дисфункції, змін у метаболізмі жирних кислот і простагландинів, ендотеліальної дисфункції та ін.

Оскільки вплив на стан системи антиоксидантного захисту (АОЗ) за умов ЦД є важливим напрямком у розробці терапевтичних засобів корекції діабетичних ускладнень, наступним етапом наших досліджень було проаналізувати вплив екстракту *P. vulgaris* на прооксидантно-антиоксидантний статус печінки та нирок щурів з моделлю ЦД 1 типу.

Для оцінки процесів ПОЛ було обрано групу показників, які характеризують інтенсивність реакцій вільнорадикального окиснення – вміст дієнових кон'югатів (первинних продуктів ПОЛ), малонового діальдегіду (МДА) (вторинних метаболітів ПОЛ) та основ Шиффа (кінцевих продуктів ліпідної пероксидації) (рис. 4.3.2.1-3).

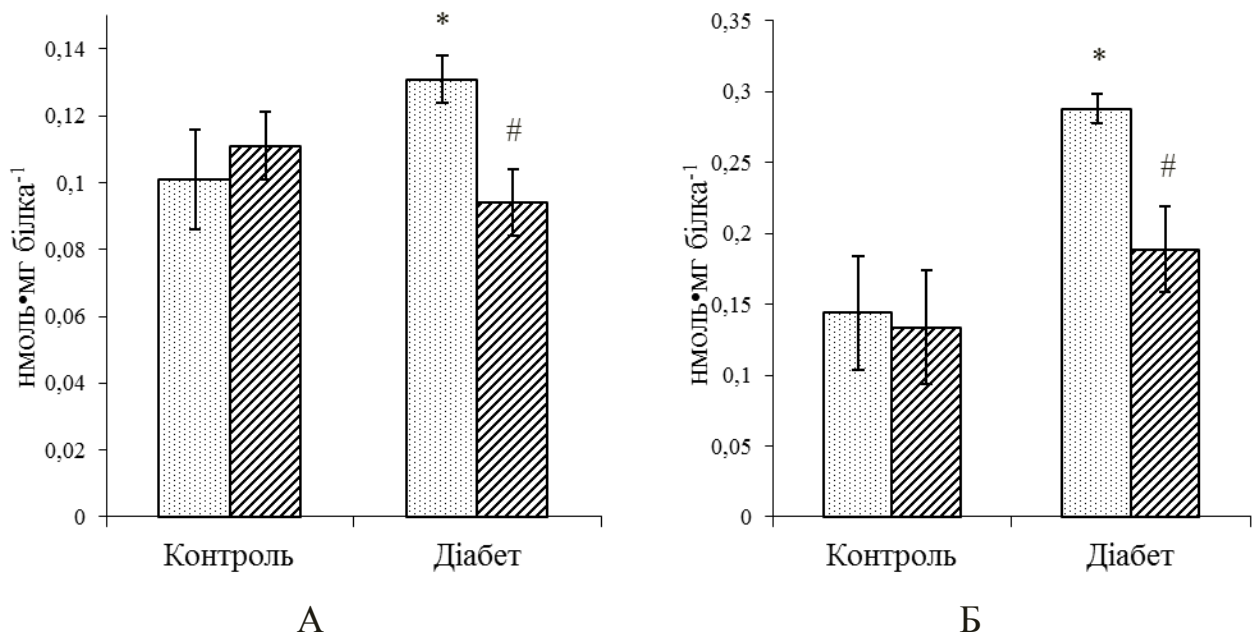


Рис. 4.3.2.1. Концентрація дієнових кон'югатів у гомогенатах печінки (А) та нирок (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Згідно з отриманими нами результатами встановлено інтенсифікацію процесів генерації продуктів ПОЛ у печінці та нирках щурів групи «Діабет» порівняно з показниками групи «Контроль» (рис. 4.3.2.1-3).

Так, у групі щурів з моделлю ЦД 1 типу концентрація дієнових кон'югатів у печінці була вищою на 30 %, порівняно з контролем, тоді як у нирках цей показник у 2 рази перевищував значення групи контрольних тварин (рис. 4.3.2.1).

Встановлено, що за умов введення екстракту *P. vulgaris* щурам з моделлю ЦД концентрація дієнових кон'югатів була меншою на 30 % у гомогенатах досліджуваних органів порівняно з групою «Діабет» (див. рис. 4.3.2.1).

У подальшому ініціація ПОЛ веде до утворення кон'югованих шифових основ фосфоліпідів та малондіальдегідподібних продуктів, які викликають порушення упорядкованої орієнтації молекул фосфоліпідів мембран (рис. 4.3.2.2).

Показано, що концентрація МДА була вищою як у печінці (на 40 %), так і в нирках (на 26 %) у групі діабетичних щурів порівняно з контрольною групою тварин (рис. 4.3.2.2).

Негативна роль малонового діальдегіду полягає в тому, що він зшиває молекули ліпідів і знижує плинність мембрани. Зміна структурної лабільності мембрани внаслідок активації вільнорадикального окиснення поліненасичених залишків жирних кислот у складі фосфоліпідів призводить до порушень у роботі внутрішньоклітинних регуляторних систем, до яких належать простагландини, циклічні нуклеотиди і транспорт Ca^{2+} .

У групі щурів з моделлю ЦД, які протягом 28 днів отримували екстракт, спостерігали знижений на 20 % рівень МДА у печінці та нирках порівняно зі значеннями групи «Діабет» (див. рис. 4.3.2.2).

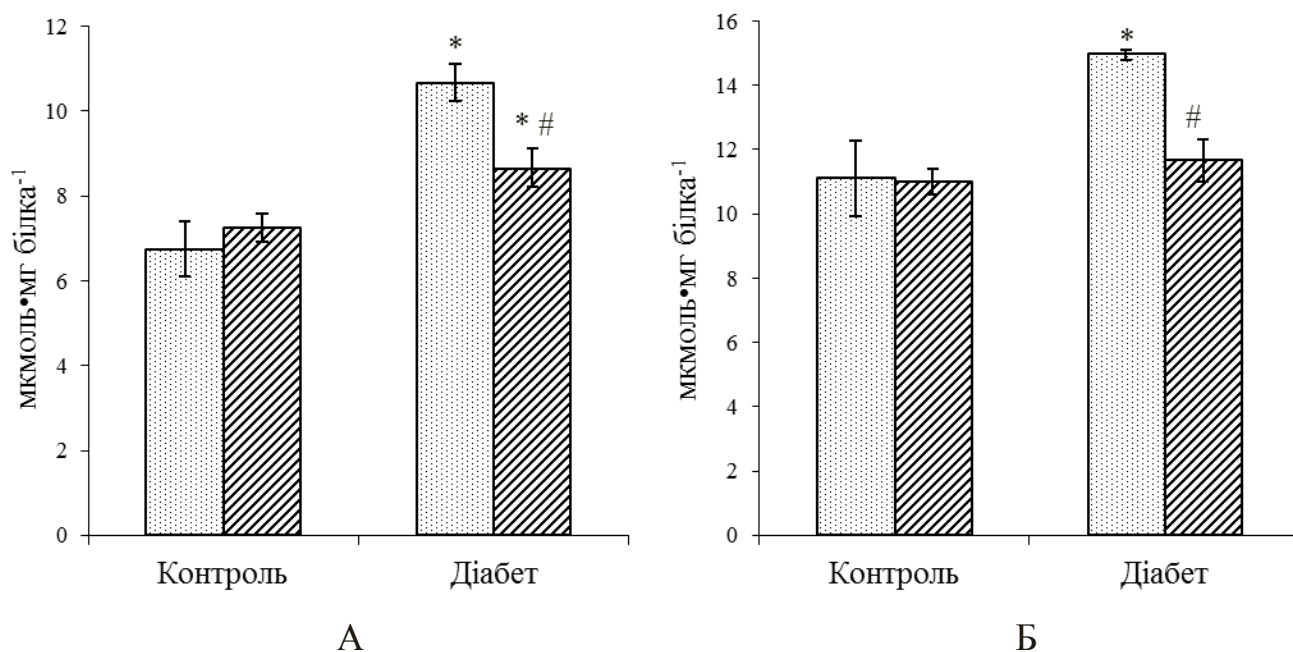


Рис. 4.3.2.2. Концентрація малонового діальдегіду у гомогенатах печінки (А) та нирок (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Шиффові основи (ШО) утворюються внаслідок оборотної реакції між карбонільною групою альдегіду чи кетону з вільною аміногрупою. Безперервне накопичення даних сполук дестабілізує мембрани і зумовлює деструкцію клітин. З літературних джерел відомо, що глюкоза неензиматичним шляхом реагує з білками, утворюючи оборотні ШО, які в подальшому можуть трансформуватись в кінцеві продукти неферментативного глікозилювання.

Показано, що у групі щурів з моделлю ЦД концентрація ШО у печінці та нирках була вищою на 40-45 % порівняно з контролем.

Встановлено, що за умов споживання екстракту щурами з моделлю ЦД 1 типу рівень ШО у цих органах був знижений на 20 % у печінці та на 30 % у нирках порівняно з діабетичними щурами, які замість екстракту отримували воду (рис. 4.3.2.3).

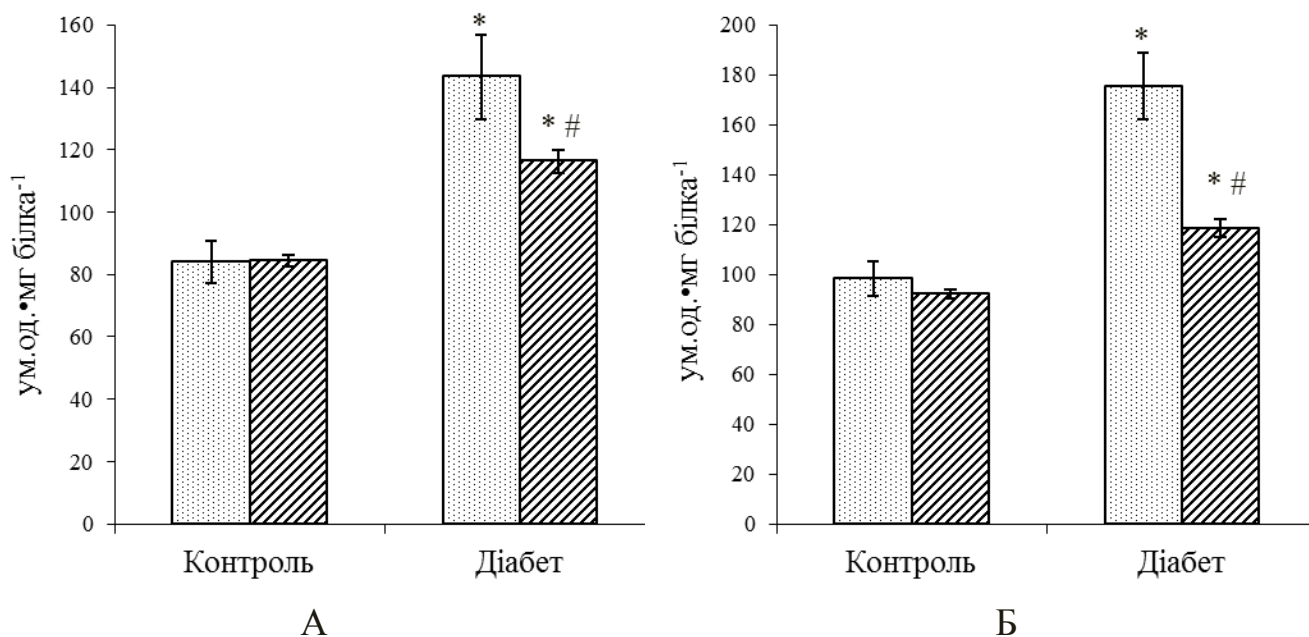


Рис. 4.3.2.3. Концентрація Шиффових основ у гомогенатах печінки (А) та нирок (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Отримані нами результати свідчать про пригнічення на тлі споживання екстракту лушпиння *P. vulgaris* процесів генерації ПОЛ, які посилювались у печінці та нирках щурів з моделлю ЦД. У групі контрольних щурів, які отримували екстракт, досліджувані параметри ПОЛ не відрізнялись від значень групи «Контроль».

За умов ЦД розвиток окислювального стресу може виникати як через посилення утворення вільнорадикальних субстратів, так і внаслідок порушень на рівні ферментативної ланки антиоксидантного захисту. Відомо, що одним із важливих компонентів антирадикального захисту є супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) та каталаза (КФ 1.11.1.6). Ми спостерігали значні відхилення показників активностей цих ферментів від контрольних за умов експериментального ЦД (рис. 4.3.2.4 та рис. 4.3.2.5).

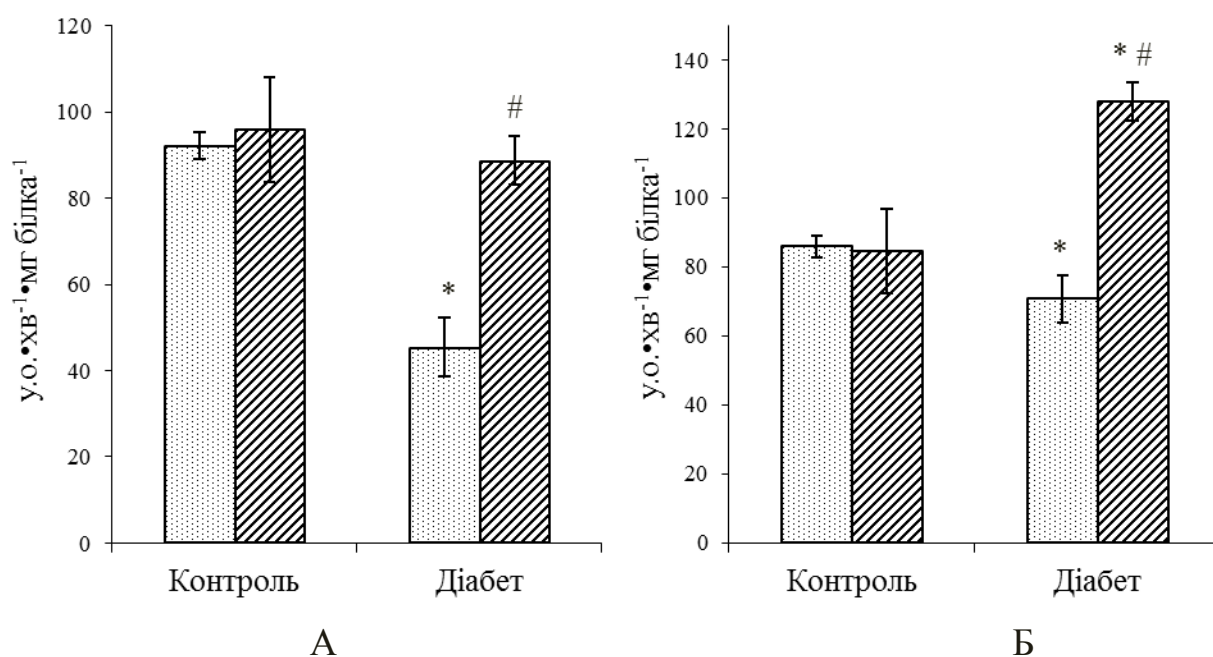


Рис. 4.3.2.4. Супероксиддисмутазна активність у гомогенатах печінки (А) та нирок (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

СОД відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті практично всіх типів клітин, каталізує дисмутацію супероксид-аніону до утворення кисню і

пероксиду водню. Встановлено, що у групі «Діабет» активність СОД печінки була у 2 рази нижчою, тоді як в нирках зниження даного показника становило 18 % порівняно з групою «Контроль» (рис. 4.3.2.4).

Зниження активності ферментів АОЗ за умов ЦД може бути зумовлене їх модифікацією як активними метаболітами кисню, так і глюкозою. Зокрема, повідомлялось, що Cu,Zn-СОД піддається неферментативному глікозилюванню за специфічними лізиновими залишками – Lys-122 та Lys-128 [243], що корелює зі зниженням активності ферменту.

Є дані про те, що діабетична гіперглікемія або інкубація очищеного ферменту з глюкозою чи фруктозою в досліджах *in vitro* викликає двостадійну фрагментацію білку-ферменту [48]. Перша стадія є сайт-специфічним розщепленням поліпептидного ланцюга між Pro-62 та His-63 і супроводжується вивільненням фрагмента з молекулярною масою 14,3 кДа. На наступній стадії відбувається випадкова фрагментація ферменту внаслідок окисної модифікації. Аналогічний процес спостерігали в разі інкубації СОД з H_2O_2 .

Показано, що у щурів групи «Діабет+*P. vulgaris*» активність СОД у печінці та нирках була вищою відповідно у 2 та 1,8 разів порівняно зі значеннями групи «Діабет» (рис. 4.3.2.4).

Ще одним важливим ферментом антиоксидантного захисту є каталаза, основна функція якої в організмі полягає у знешкодженні пероксиду водню, що утворився у результаті дисмутації супероксиданіону СОД. Зміни активності каталази у досліджуваних органах щурів з моделлю ЦД мали різноспрямований характер: у гомогенаті печінки ми спостерігали зниження показника активності у 1,9 разів, тоді як у гомогенаті нирок він зростав на 40 % порівняно з відповідними показниками щурів групи «Контроль» (рис. 4.3.2.5).

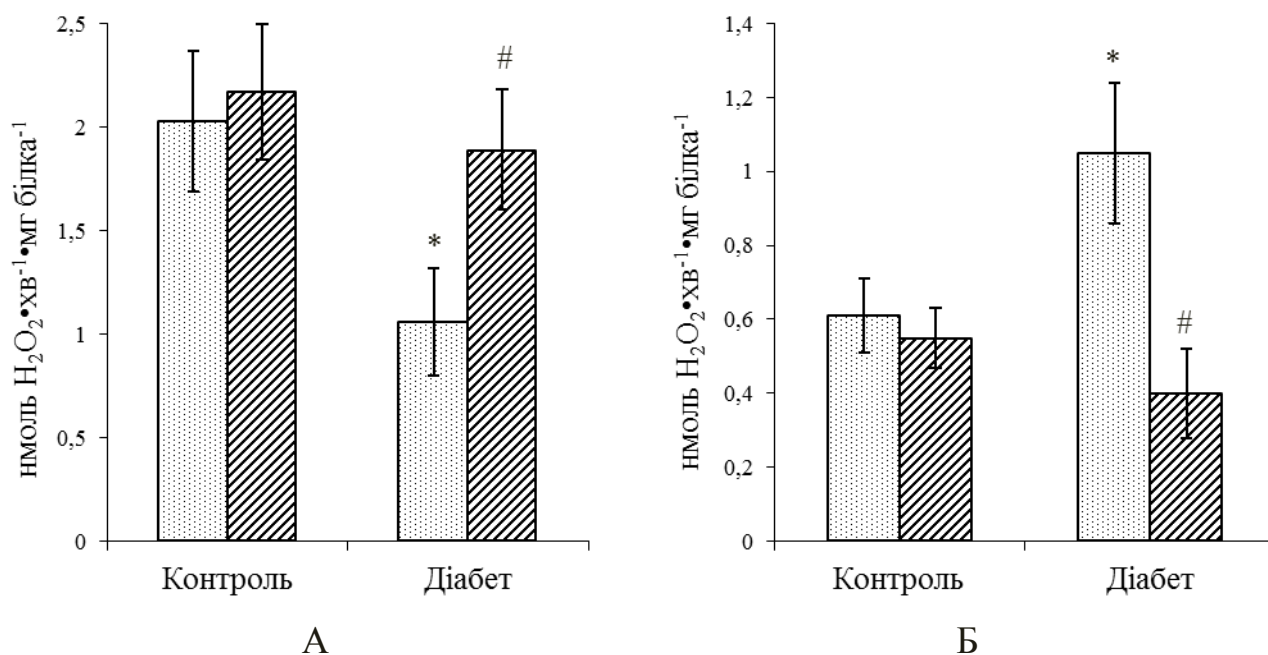


Рис. 4.3.2.5. Каталазна активність у гомогенатах печінки (А) та нирок (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

На сьогодні залишається до кінця не зрозумілим механізм поведінки даного ферменту в умовах патології ЦД, оскільки рядом досліджень щоразу констатуються різноспрямовані зміни каталазної активності (як надактивація, так і зниження активності ферменту) у тканинах різних органів [243, 244]. Повідомлялось, що експресія гену каталази регулюється перексидом водню [244]. Можливо виявлене нами зменшення її активності у печінці при змодельованому ЦД зумовлене зниженням синтезу ферменту у відповідь на недостатню генерацію H_2O_2 – наслідок зниження ферментативної активності СОД. Зниження каталазної активності у печінці може також бути результатом гіперглікемічних станів в умовах ЦД, оскільки в інших роботах

активність цього ферменту в печінці відновлювалась в результаті інсулінотерапії [245], що вказує на можливість модифікації каталази глюкозою. В той же час надактивацію каталази в нирках щурів з моделлю ЦД 1 типу можна розглядати як компенсаторний механізм, що має місце за умов зниження активності глутатіонпероксидази в нирках (табл. 4.3.2.2).

Встановлено, що у щурів групи «Діабет+*P. vulgaris*» каталазна активність в печінці була більшою в 1,8 рази, в той час як у нирках даний показник був знижений у 2,6 рази порівняно з групою «Діабет» (див. рис. 4.3.2.5). Таким чином, за умов споживання екстракту спостерігали нормалізацію активності цих ферментів АОЗ у групі тварин з моделлю ЦД, більш того величини цих параметрів були наближені до контрольних (група «Контроль»). Не було встановлено вірогідних відмінностей між означеними показниками у групах «Контроль» та «Контроль+*P. vulgaris*».

Важлива роль у забезпеченні стабільності структури та функції цитозольних та мембранних білків клітини належить глутатіон-залежній ланці антиоксидантного захисту. Відновлений глутатіон (GSH) — трипептид з вільною сульфгідрильною групою, є одним з найбільш реакційноздатних антиоксидантів. Біохімічна функція глутатіону в організмі пов'язана з відновленням і детоксикацією органічних пероксидів. Гомеостаз відновленого глутатіону в клітині забезпечується за участі ферменту глутатіонредуктази (ГР; КФ 1.6.4.2). Даний фермент опосередковує зворотне відновлення глутатіону з його окисленої форми. Глутатіонзалежні ферменти, такі як глутатіонпероксидаза (ГП; КФ 1.11.1.9.) та глутатіонтрансфераза (ГТ; КФ 2.5.1.8), окиснюючи відновлений глутатіон, відіграють ключову роль в механізмах захисту клітин від екзогенних та ендогенних токсичних сполук та вільних радикалів, надмірна продукція яких має місце за умов ЦД. Каталізуючи реакцію окислення глутатіону, як і каталаза, глутатіонпероксидаза опосередковує дезактивацію пероксиду водню, а також розкладає гідропероксиди ліпідів з малим розміром молекул. Глутатіон-S-трансфераза, використовуючи відновлений глутатіон, відновлює гідрофобні

гідропероксиди з великим об'ємом молекул, зокрема гідропероксиди полінасичених жирних кислот, мононуклеотидів та інших токсичних продуктів пероксидного окислення ліпідів.

Як видно з таблиці 4.3.2.1, активність ГП у печінці щурів групи «Діабет» була зниженою в 1,7 разів порівняно з показником групи «Контроль», тоді як активність ГТ була зниженою на 30 % за даних умов. В той же час не було встановлено вірогідних відмінностей при дослідженні активності ГР в межах цих груп тварин.

Таблиця 4.3.2.1.

Активність глутатіонпероксидази (ГП), глутатіон-S-трансферази (ГТ) та глутатіонредуктази (ГР) у гомогенаті печінки на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

Група тварин	ГП (мкмоль GSH/хв ⁻¹ •мг білка ⁻¹)	ГТ (мкмоль ХДНБ/хв ⁻¹ •мг білка ⁻¹)	ГР (мкмоль НАДФН /хв ⁻¹ •мг білка ⁻¹)
Контроль	4,08±0,36	2,76±0,17	0,56±0,05
Контроль+ <i>P. vulgaris</i>	4,80±0,29	2,62±0,26	0,57±0,06
Діабет	2,43±0,31*	2,07±0,15*	0,65±0,06
Діабет+ <i>P. vulgaris</i>	2,85±0,13*	2,69±0,17#	0,55±0,04

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Показано, що у печінці щурів з моделлю ЦД, які отримували водний екстракт лушпиння *P. vulgaris*, спостерігали підвищений рівень активності ГП та ГТ відповідно на 20 та 30%, порівняно з групою щурів «Діабет» (див. табл. 4.3.2.1).

Порівнюючи активність глутатіон-залежних ферментів в нирках щурів з ЦД та контрольних тварин, встановлено зниження активності ГП у на 40 % та ГТ на 36 % за умов змодельованої патології. Тоді як на відміну від ГП та

ГТ, активність ГР у групі «Діабет» була підвищеною на 30 % порівняно з групою «Контроль», що може бути спричинено компенсаторною активацією цього ферменту, спрямованою на генерацію антиоксиданту відновленого глутатіону у відповідь на активацію ПОЛ (табл. 4.3.2.2).

Показано, що у щурів групи «Діабет+*P. vulgaris*» внаслідок споживання екстракту активність ГП у нирках була вищою на 20 %, тоді як для ГТ було показане значне зростання активності (у 2 рази), порівняно зі значеннями групи «Діабет». За даних умов не було встановлено вірогідних відмінностей при дослідженні активності ГР в межах цих двох груп (див. табл. 4.3.2.2.).

Таблиця 4.3.2.2.

Активність глутатіонпероксидази (ГП), глутатіон-S-трансферази (ГТ) та глутатіонредуктази (ГР) у гомогенаті нирок на фоні введення екстракту *P.vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

Група тварин	ГП (мкмоль GSH/хв ⁻¹ •мг білка ⁻¹)	ГТ (мкмоль ХДНБ/хв ⁻¹ •мг білка ⁻¹)	ГР (мкмоль НАДФН/хв ⁻¹ •мг білка ⁻¹)
Контроль	6,01±0,22	0,66±0,05	0,66±0,08
Контроль <i>P. vulgaris</i>	5,19±0,28	0,61±0,03	0,69±0,05
Діабет	3,67±0,16*	0,42±0,06*	0,95±0,09*
Діабет <i>P. vulgaris</i>	4,55±0,12*#	0,86±0,05*#	0,99±0,12*

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Отже, отримані результати вказують на відновлення глутатіон-залежної ферментативної ланки АОЗ у діабетичних щурів за умов споживання екстракту *P. vulgaris*.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що за умов довготривалого перорального введення екстракту лушпиння *P.vulgaris*

поліпшуються показники прооксидантно-антиоксидантного статусу у печінці та нирках щурів з моделлю ЦД 1 типу.

4.3.3. Рівень цитокінів та імуноглобулінів класу G у сироватці крові щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту *P.vulgaris*.

Неконтрольовані запальні та імунні реакції відіграють ключову роль в патогенезі ЦД 1 типу, оскільки можуть призводити до інфільтрації інсулінопродукуючих β -клітин, активуючи в них апоптичні процеси, а також порушення гормон-рецепторної взаємодії на рівні IP. За таких умов здебільшого розвиток подій відбувається шляхом створення цитотоксичного профілю CD4+ T-клітин, а саме зсув Th1 та Th2 балансу в бік запального процесу (Th1). Th1 клітини продукують прозапальні цитокіни: $INF\gamma$, $TNF\alpha$, IL-1, IL-2 та IL-12, які регулюють клітинний імунітет та опосередковують за певних умов клітинну загибель, тоді як Th2 стимулюють гуморальний імунітет та продукують протизапальні цитокіни (IL 4-6, 10, 13), які послаблюють дію Th1 ланки імунітету.

Показано, що за умов ЦД рівень IL-1 β у групі «Діабет» був збільшеним на 60%, порівняно з групою «Контроль». Величини показників сироваткових IL-12 and $IFN-\gamma$ статистично не відрізнялись в межах цих двох груп щурів (рис. 4.3.3.1).

У групі діабетичних щурів, які отримували екстракт *P. vulgaris*, рівень IL-1 β був нижчим на 57 %, порівняно з тваринами з моделлю ЦД, які отримували воду. Споживання екстракту не впливало на показники рівня IL-12 та $IFN-\gamma$ за даних умов (рис. 4.3.3.1).

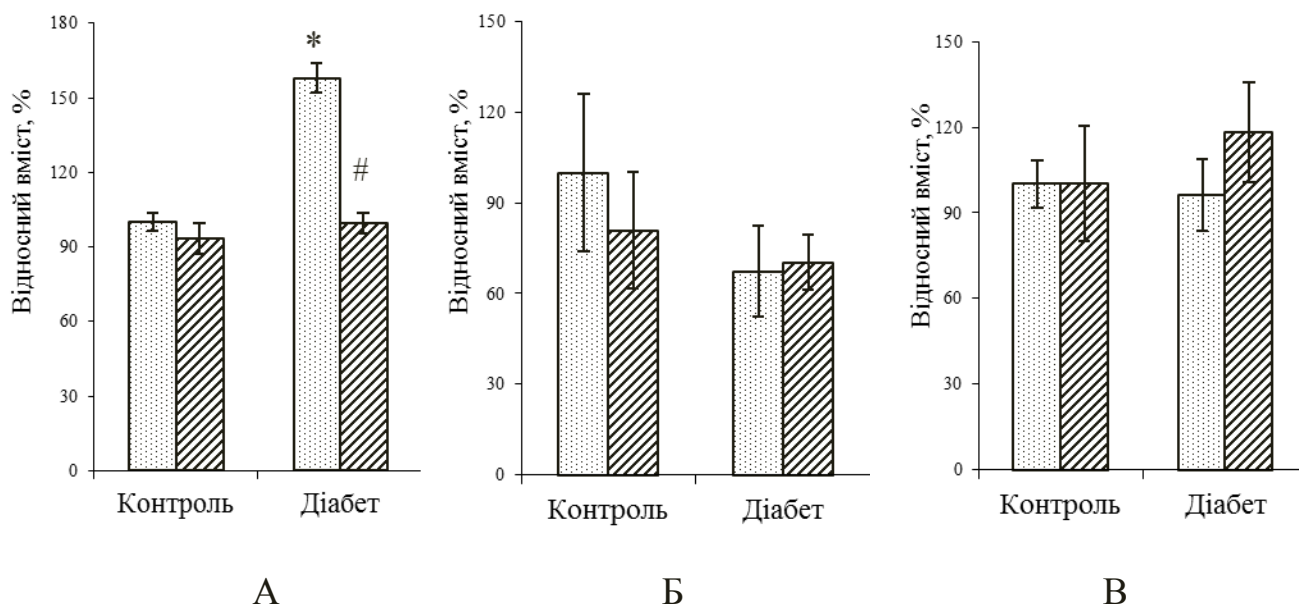


Рис. 4.3.3.1. Відносний вміст прозапальних цитокінів ІЛ-1 β (А), ІЛ-12 (Б) та ІFN- γ (В) в сироватці крові на фоні введення екстракту *P.vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Встановлено, що рівень протизапальних цитокінів у сироватці крові діабетичних щурів був збільшений порівняно з контрольною групою: ІЛ-4 – у 2,5 рази, а ІЛ-10 – у 4 рази, (рис. 4.3.3.2).

Для групи тварин з моделлю ЦД, які протягом 28 днів отримували екстракт *P. vulgaris*, показано зростання рівня протизапальних цитокінів, порівняно з тваринами з моделлю ЦД, які не отримували екстракт, а саме у 1,4 та 1,8 рази, відповідно, для ІЛ-4 та ІЛ-10 (рис. 4.3.3.2).

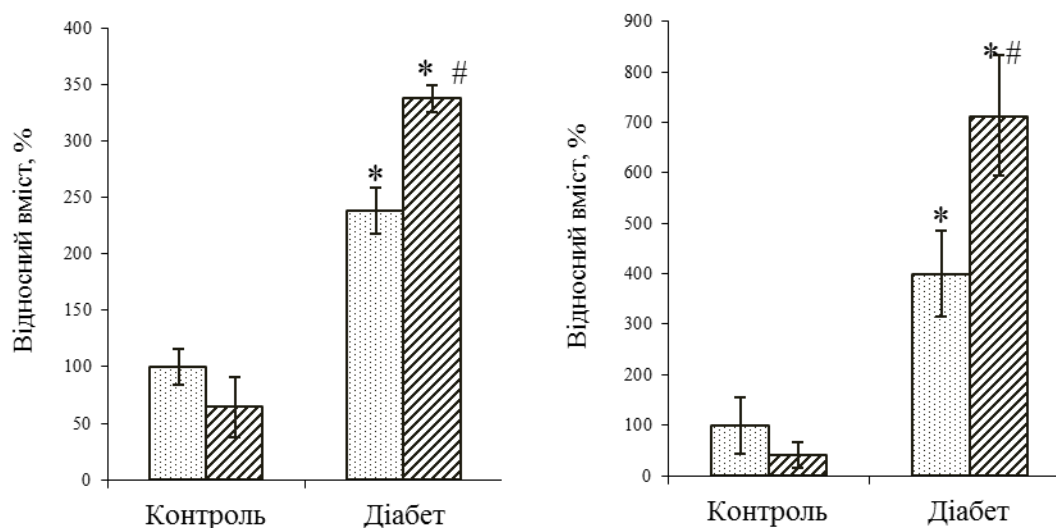


Рис. 4.3.3.2. Відносний вміст протизапальних цитокінів ІЛ-4 (А) та ІЛ-10 (Б) в сироватці крові на фоні введення екстракту *P.vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

У групі контрольних тварин, які споживали водний екстракт лушпиння *P. vulgaris*, не було встановлено змін показників цитокінового профілю.

ЦД 1 типу є органоспецифічним аутоімунним захворюванням, яке характеризується присутністю різних типів аутоантитіл, які разом з відповідними антигенами формують імунні комплекси та циркулюють у кровотоці. Наявність додаткових типів імуноглобулінів, які формують ці комплекси, є характерною ознакою патологічної імунної відповіді за умов ЦД 1 типу. Одним із показників, які доповнюють клінічну картину ЦД 1 типу є підвищений рівень імуноглобулінів класу G (IgG) в крові, які, зокрема, відіграють важливу роль в судинних ускладненнях ЦД (рис. 4.3.3.3) [245].

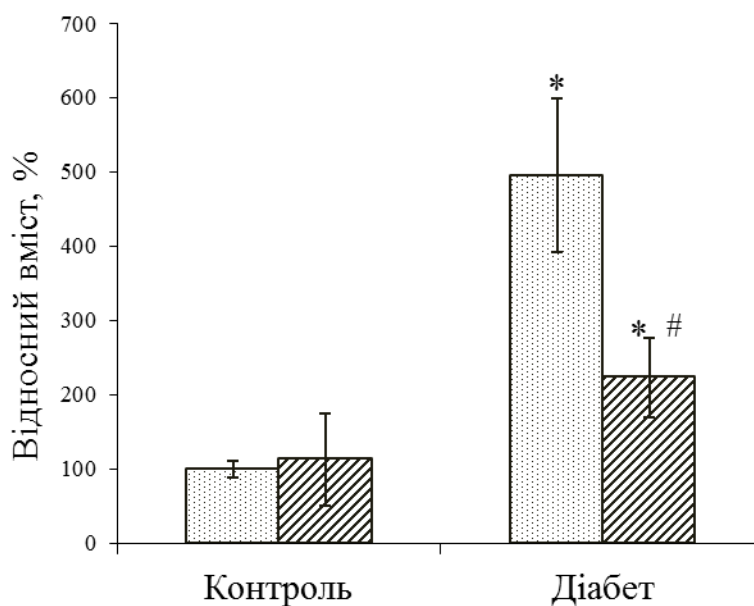


Рис. 4.3.3.3. Відносний вміст імуноглобулінів класу G у сироватці крові на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▩ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Показано, що рівень IgG у сироватці крові щурів з моделлю ЦД у 5 разів перевищував значення контрольних тварин (див. рис. 4.3.3.3). У групі діабетичних тварин, які протягом 28 днів отримували екстракт *P. vulgaris*, цей показник був у 2,2 рази нижчим порівняно з діабетичними щурами, які замість екстракту отримували воду, однак залишався вищим у 2,3 рази порівняно з показником групи «Контроль». Варто зазначити, що у групі контрольних тварин введення екстракту не призводило до змін рівня IgG в крові (див. рис. 4.3.3.3).

Аналізуючи вищезазначені результати, можна зробити висновок, що довготривале введення водного екстракту лушпиння *P. vulgaris* щурам з моделлю ЦД, окрім поліпшення стану системи АОЗ при даній патології,

чинить також сприятливу дію на імунні процеси, дисбаланс яких є невід'ємною патогенетичною ланкою запального процесу за умов ЦД.

4.3.4. Інсулінозалежні процеси внутрішньоклітинного метаболізму глюкози у печінці та м'язовій тканині щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу на фоні введення екстракту *P. vulgaris*

Згідно результатів попередніх досліджень показано, що за умов довготривалого введення екстракту *P. vulgaris* як контрольним щурам, так і щурам з моделлю ЦД 1 типу спостерігали посилення засвоєння глюкози клітинами гемідіафрагм дослідних тварин (рис. 4.2.2). Зважаючи на низький вміст інсуліну в сироватці тварин з моделлю діабету (рис. 4.3.1.4, В), можна припустити, що посилення глюкозоутилізуючої функції периферичних тканин може бути наслідком прямого впливу активних фітокомпонентів сухого екстракту *P. vulgaris* на периферичні тканини, залучені до внутрішньоклітинної утилізації глюкози.

Скелетний м'яз відіграє ключову роль у визначенні системної інсулінорезистентності при ЦД 1 типу, оскільки саме цією тканиною засвоюється до 80% глюкози внаслідок стимуляції інсуліном. Саме тому для більш детального вивчення механізмів дії екстракту *P. vulgaris* на інсулінозалежні внутрішньоклітинні процеси м'язова тканина були обрана нами як об'єкт подальших досліджень.

Початковою ланкою внутрішньоклітинного сигнального каскаду, через який реалізується метаболічна дія інсуліну, є інсуліновий рецептор (ІР) мембранозв'язана тирозинова протеїнкіназа (КФ 2.7.1.112). Внаслідок активації ІР здійснюється автофосфорилування його β -субодиниць та посилення у такий спосіб сигналу від інсуліну. Метаболічна дія інсуліну опосередковується головним чином шляхом фосфорилування білків-субстратів ІР (IRS) та подальшої активації протеїнкіназ PI3K, PDK1, Akt/PKB

та/або РКС, що призводить до регуляції інсуліном засвоєння глюкози клітиною через активацію білка-транспортера глюкози GLUT-4 та подальших процесів глікогенезу, аеробного окиснення глюкози, засвоєння та метаболізму ВЖК, інгібування процесів глікогенезу [184-187].

В результаті досліджень встановлено, що загальна мембранозв'язана ТПКазна активність у клітинах м'язової тканини щурів групи «Діабет» була нижчою у 2,6 рази порівняно з активністю у тканинах групи «Контроль» (рис. 4.3.4.1).

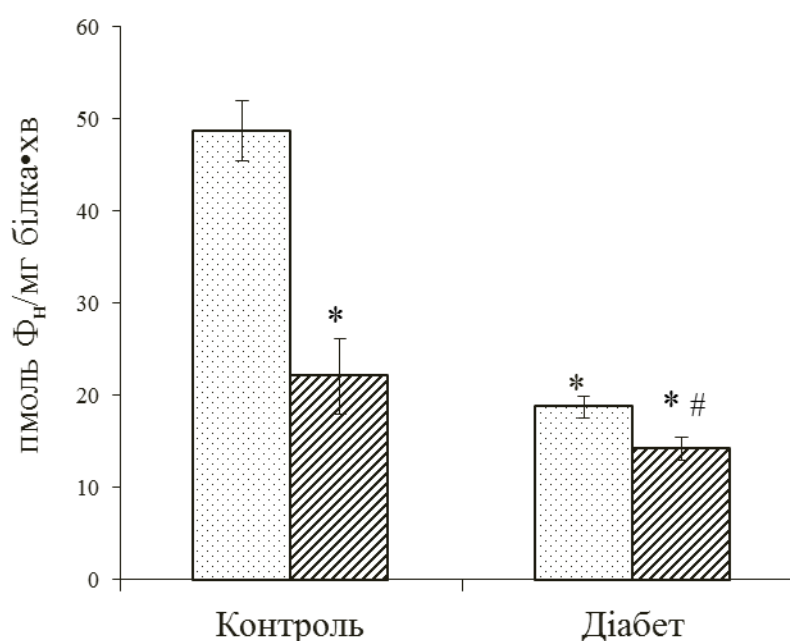


Рис. 4.3.4.1. Загальна тирозинпротеїнкіназна активність у мембранній фракції клітин м'язової тканини на фоні введення екстракту лушпиння *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з моделлю ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Однак, на фоні довготривалого введення досліджуваного екстракту як контрольним щурам, так і тваринам з моделлю ЦД 1 типу, ми спостерігали

зниження загальної мембранозв'язаної ТПКазної активності у клітинах м'язової тканини, порівняно з показниками відповідних груп тварин, які замість екстракту отримували воду (рис. 4.3.4.1). Так, у групі «Контроль+*P. vulgaris*» даний параметр був меншим у 2,2 рази порівняно з групою «Контроль», а у групі «Діабет+*P. vulgaris*» загальна ТПКазна активність була нижчою на 22 % порівняно з показником групи «Діабет». Отримані нами результати свідчать про інгібуючий ефект екстракту *P. vulgaris* на мембранозв'язані тирозинові протейнінази.

Серед мембранних білків є ряд ферментів з тирозинкіназною активністю і тому остаточно зробити висновок щодо впливу фітокомпонентів екстракту на активність саме інсулінового рецептора наразі не є можливим. Проте, гіпотетично, зниження ТПКазної активності може бути наслідком або прямого впливу на фермент-мішень, зокрема рецептор до інсуліну, або зниженням кількості молекул тирозинкіназ у складі мембрани [200]. Загалом зниження вмісту інсулінового рецептора в мембранах клітин інсулінозалежних тканин є можливим внаслідок зменшення концентрації його ліганду в кров'яному руслі протягом тривалого часу, оскільки використана нами модель ЦД передбачає селективне ушкодження інсулінопродукуючих β -клітин підшлункової залози стрептозотоцином [211]. Це може пояснити зниження ТПКазної активності у тканинах щурів з моделлю ЦД, для яких підтверджено стан гіпоінсулінемії (рис. 4.3.1.4, В). Однак, зниження показника ТПКазної активності у групі щурів «Контроль+*P. vulgaris*» пояснити з цієї позиції не можна, оскільки рівень гормону у сироватці крові тварин даної групи був на рівні групи «Контроль». Тому нами було визначено вміст інсулінового рецептора в мембранній фракції клітин м'язової тканини контрольних щурів та щурів з моделлю ЦД 1 типу за умов довготривалого введення екстракту лушпиння *P. vulgaris*. В ході дослідження загального вмісту ІР за даних умов не було встановлено вірогідних відмінностей в межах досліджуваних груп (рис. 4.3.4.2).

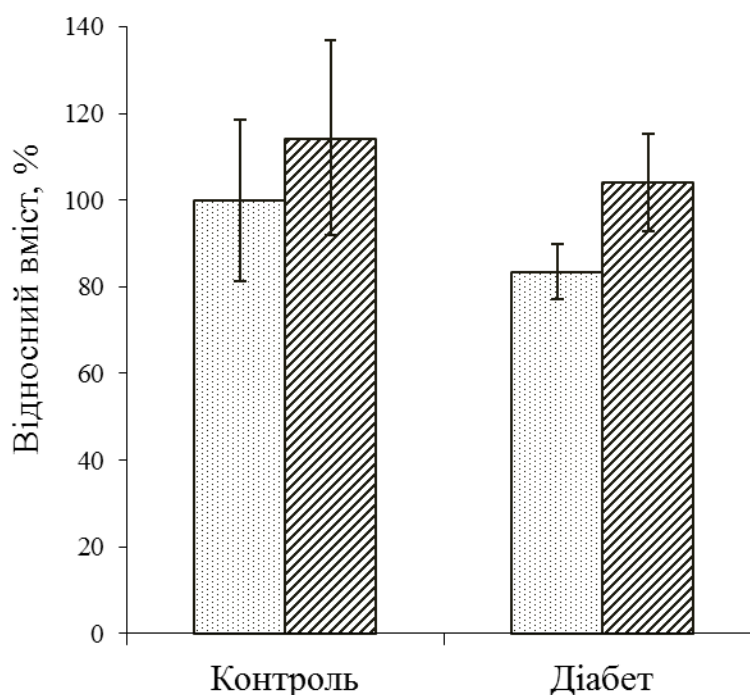


Рис. 4.3.4.2. Відносний вміст інсулінового рецептора у мембранній фракції клітин м'язової тканини на фоні 28 денного введення їм водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з моделлю ЦД 1 типу, $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▩ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Оскільки за умов впливу екстракту посилюється процес утилізації глюкози гемідіафрагмою, який не спричинений збільшенням концентрації інсуліну в кров'яному руслі діабетичних щурів та збільшенням кількості ІР в складі плазматичних мембран м'язової тканини, було висунуто припущення, що активні складові екстракту можуть діяти на внутрішньоклітинні компоненти інсулінової сигнальної системи поза рецепторним шляхом.

Надходження глюкози всередину клітин периферичних тканин можливе за рахунок функціонування трансмембранних транспортерів глюкози – білків

GLUT. На сьогодні відомо про чотирнадцять різних ізоформ переносників глюкози, які різняться за тканинною специфічністю в залежності від обсягів засвоєння глюкози та інших моносахаридів цими тканинами. Однак найбільш поширеними є транспортери GLUT 1-4. Зокрема в ендотеліальних клітинах, які вистилають кровоносні судини, а також знаходяться на межі гематоенцефалічного бар'єру, переважно експресується GLUT-1. Відомо, що за участі GLUT-1, окрім глюкози, може транспортуватись маноза, галактоза, глюкозамін. Цей транспортер також може експресуватись разом з GLUT-4 в м'язовій та жировій тканинах. GLUT-2 експресується в клітинах проксимальних звивистих каналців нирок, панкреатичних β -клітинах та гепатоцитах. Особливістю цього транспортеру є те, що він може переносити глюкозу як в клітину, так і з неї, а також характеризується низькою афінністю до глюкози. За умов ЦД було показано зниження експресії GLUT-2 в β -клітинах підшлункової залози, тоді як в клітинах печінки синтез даного білка збільшувався при даній патології. GLUT-3 є високоафінним по відношенню до глюкози й експресується переважно в мозку та плаценті. GLUT-4 функціонує здебільшого в скелетних м'язах, жировій тканині, а також у кардіоміоцитах. В інсулінозалежних тканинах GLUT-4 знаходиться у складі внутрішньоклітинних везикул, які транспортуються до клітинної мембрани у випадку стимуляції інсуліном. Більш того, експресія GLUT-4 також регулюється інсуліном [244]. Ці події опосередковуються шляхом функціонування двох паралельних сигнальних шляхів: IRS/PI3K/ PDK1/АКТ/ AS160 та APS/Cb1/CAP/ TC10. Ряд дослідників спостерігали порушення цих процесів за умов аберантних інсулін-рецепторних взаємодій [212-220].

Оскільки ми спостерігали посилення утилізації глюкози, логічно було припустити, що довготривале введення екстракту *P. vulgaris* може впливати на вміст внутрішньоклітинного GLUT4 в м'язовій тканині діабетичних щурів. У ході проведених досліджень встановлено, що у групі щурів «Діабет» вміст GLUT-4 був знижений на 25 % порівняно з групою

«Контроль» (рис. 4.3.4.3), що може бути наслідком зниження його експресії в результаті довготривалої гіпоінсулінемії.

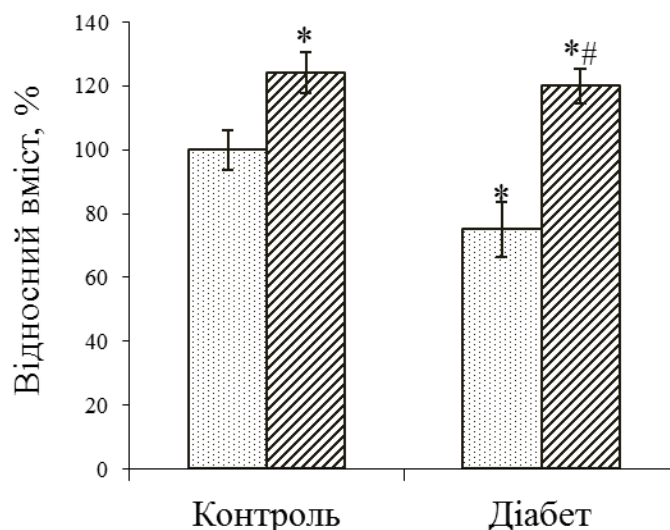


Рис. 4.3.4.3. Відносний вміст GLUT-4 у м'язовій тканині на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з моделлю ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▩ – екстракт

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Цікаво, що на фоні довготривалого введення досліджуваного екстракту як контрольним щурам, так і тваринам з моделлю ЦД, ми спостерігали зростання загального вмісту білку-транспортю глюкози GLUT-4 у клітинах м'язової тканини. Так, загальний вміст GLUT-4 у м'язовій тканині щурів групи «Діабет+*P. vulgaris*» був на 45 % вищий, ніж у групі тварин «Діабет», а у тканині щурів групи «Контроль+*P. vulgaris*» – на 25 % вище, порівняно з показником групи «Контроль» (рис. 4.3.4.3).

Стимуляція засвоєння глюкози інсулінозалежними тканинами може відбуватися також інсуліннезалежним шляхом, за участі

аденозинмонофосфат-протеїнкінази (AMP-dependent protein kinase, АМПК). За участі серин/треонінової АМПК може здійснюватись регуляція метаболічних процесів для забезпечення енергетичного балансу клітини. Участь яких саме метаболічних та/або імунних факторів задіяна в регуляції цього ферменту на сьогодні залишається недослідженим. Однак відомо, що зниження енергетичного балансу клітини – збільшення співвідношення АМФ/АТФ з одного боку та/або збільшення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} активує АМПК. Ці події є передумовою стимуляції утилізації глюкози в м'язових клітинах шляхом фосфорилування білка AS160, що призводить до активації транслокації GLUT-4 та зниження продукції ферментів глюконеогенезу в печінці [185, 195, 204].

Цукрознижувальні властивості рослинних екстрактів часто пов'язані зі здатністю їх активних компонентів, переважно флавоноїдної природи, чинити вплив на внутрішньоклітинні сигнальні молекули інсулінового каскаду. Зокрема численні дослідження доводять їх здатність активувати PI3K/Akt шлях та збільшувати в такий спосіб експресію GLUT-4, що відновлює чутливість клітин-мішеней інсуліну [244]. Було показано, що флавоноїд епікатехін посилював сигнальний шлях інсуліну шляхом активації ключових білків IR/IRS, PI3K/AKT шляху та АМПК, регулюючи таким чином процес глюконеогенезу в гепатоцитах лінії HepG2 [245]. Шляхом активації АКТ флавоноїди каемпферитрин та рутин стимулювали як синтез, так і транслокацію GLUT-4 в адипоцитах та клітинах скелетних м'язів [246]. Позитивний вплив миріцетину на процес активації IR/IRS-1 та PI3K/AKT з подальшим зростанням експресії GLUT-4 внаслідок поліпшення чутливості до інсуліну спостерігали у клітинах м'язової тканини щурів, які утримувались на фруктозній дієті [247]. Ціанідин-3-о- β -глюкозид, а також його метаболіт протокатехова кислота чинили інсуліноподібні ефекти шляхом активації рецептора PPAR γ , з подальшою активацією транслокації GLUT-4 в людських адипоцитах [248].

Відомо, що після надходження глюкози в клітини периферичних тканин глюкоза зазнає ряд метаболічних перетворень, кінцевою метою яких є її використання як джерела енергії або запасання у вигляді глікогену. Відомо, що за умов ЦД 1 типу, окрім м'язової тканини, порушення інсулінового сигналу яскраво відображається і в печінці, зокрема, на рівні синтезу глікогену та інгібування процесів гліогенезу [249].

Гексокізна реакція проходить всередині клітини та опосередковує перетворення глюкози на глюкозо-6-фосфат. Відомо про існування щонайменше чотирьох тканинспецифічних ізоформ гексокінази (I-IV), які змінюють свою активність під впливом гормонів, у першу чергу інсуліну. Гексокіназа IV – глікокіназа, яка експресується виключно в печінці і функціонує як сенсор високих концентрацій глюкози, регулюючи як синтез глікогену, так і швидкість гліколізу в цьому органі. В таких інсулінозалежних тканинах, як скелетні м'язи і жирова, особливо активна гексокіназа II, активність якої корелює з переміщенням білка-транспортера глюкози GLUT-4. Однак найбільші можливості щодо утилізації глюкози має печінка, в клітинах якої окрім повного набору ізоферментів гексокінази експресується інший білок-транспортер глюкози – GLUT-2, функціонування якого не контролюється інсуліном, що, власне, і надало підставу віднести печінку до інсуліннезалежних органів [250].

Результати дослідження гексокізнакої активності в печінці та м'язовій тканині щурів усіх дослідних груп представлені на рисунку 4.3.4.4. У групі тварин «Діабет», гексокізна активність у тканині печінки була знижена майже у 2,5 раза, порівняно з показниками активності даного ферменту у групі «Контроль» (рис. 4.3.4.4, А). Гексокізна активність у тканині печінки тварин з моделлю ЦД, які вживали водний екстракт лущиння квасолі, була у 1,6 раза вищою, ніж у групі діабетичних тварин, які отримували воду, однак залишалася статистично достовірно нижчою значень групи контрольних тварин, які замість екстракту отримували воду (рис. 4.3.4.4, А).

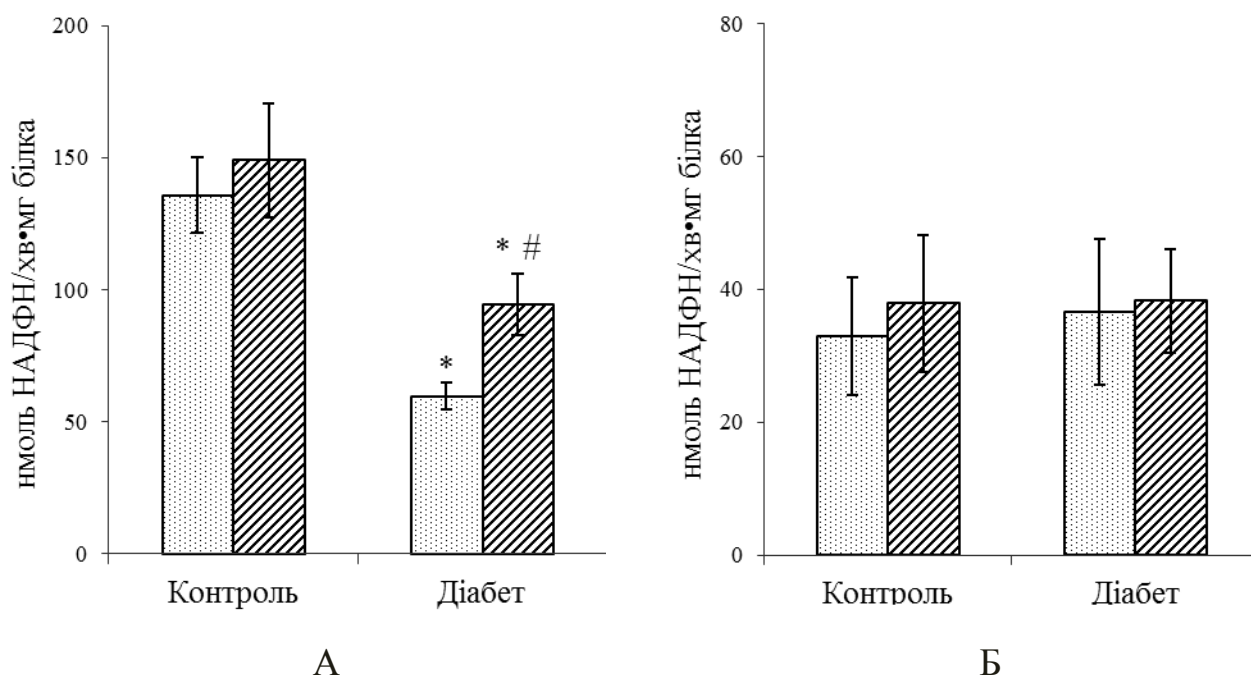


Рис. 4.3.4.4. Гексокіназна активність у клітинах печінки (А) та м'язової тканини (Б) на фоні введення екстракту *P. vulgaris* контрольним щурам та щурам з ЦД 1 типу; $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▨ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

При дослідженні гексокіназної активності в м'язовій тканині дослідних тварин не було встановлено достовірних міжгрупових відмінностей (рис. 4.3.4.4, Б). Такі результати можна пояснити спираючись на експериментальні дані інших дослідників, які показали, що за умов стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів спостерігається зниження інсулінзалежної експресії гену гексокінази II головним чином у жировій тканині, тоді як вміст мРНК цього ферменту в скелетних м'язах залишається незмінним [250].

Одним із шляхів подальшого внутрішньоклітинного перетворення глюкозо-6-фосфату, продукту гексокіназної реакції, є синтез глікогену. У

незначній мірі біосинтез глікогену відбувається майже у всіх тканинах організму, проте найбільше він виражений у печінці та м'язах. Ключовим ферментом даного процесу є глікогенсинтаза, яка є кінцевою мішенню фосфатидилінозитол-3-кіназного сигнального каскаду, що активується у відповідь на дію інсуліну. Глікогенсинтаза каталізує перенесення залишку глюкози від УДФ-глюкози на глікоген. Ця реакція є швидкість-лімітуючою стадією синтезу глікогену. На каталітичну активність даного ферменту можуть впливати як алостеричні модулятори (глюкозо-6-фосфат), так і ковалентна модифікація. Процес фосфорилування/дефосфорилування молекули глікогенсинтази регулюється протеїнкіназою А, кіназою глікогенсинтази 3 – ферментами, які є складовою частиною каскадних механізмів дії інсуліну на клітини. В умовах патогенезу ЦД відмічено ряд порушень у регуляції функціонування глікогенсинтази [250-252].

Результати дослідження глікогенсинтазної активності в печінці та м'язовій тканині щурів усіх дослідних груп представлені на рисунку 4.3.16. Показано, що у тварин групи «Діабет» глікогенсинтазна активність у клітинах печінки та м'язів була зниженою відповідно у 2,2 та 2,5 рази, порівняно зі значеннями групи «Контроль» (рис. 4.3.4.5).

У тварин групи «Діабет+*P. vulgaris*», глікогенсинтазна активність у клітинах м'язової тканини була на рівні значень групи «Контроль» (рис. 4.3.4.5, Б), тоді як показник активності даного ферменту в печінці був знижений у 3,3 рази, порівняно з групою «Контроль», та не відрізнявся статистично від показників групи тварин «Діабет» (рис. 4.3.4.5, А).

Як було зазначено раніше, процес синтезу глікогену є інсулінозалежним, а отже низькі показники глікогенсинтазної активності в клітинах печінки та м'язів щурів з моделлю ЦД типу можна пояснити низьким рівнем інсуліну в крові. Однак, як свідчать наші результати, за умов споживання екстракту *P. vulgaris* тваринами з моделлю ЦД відзначалося підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини на фоні достовірно низького рівня інсуліну, що може бути наслідком прямого впливу

фітокомпонентів екстракту квасолі на сигнальні молекули інсулінового каскаду.

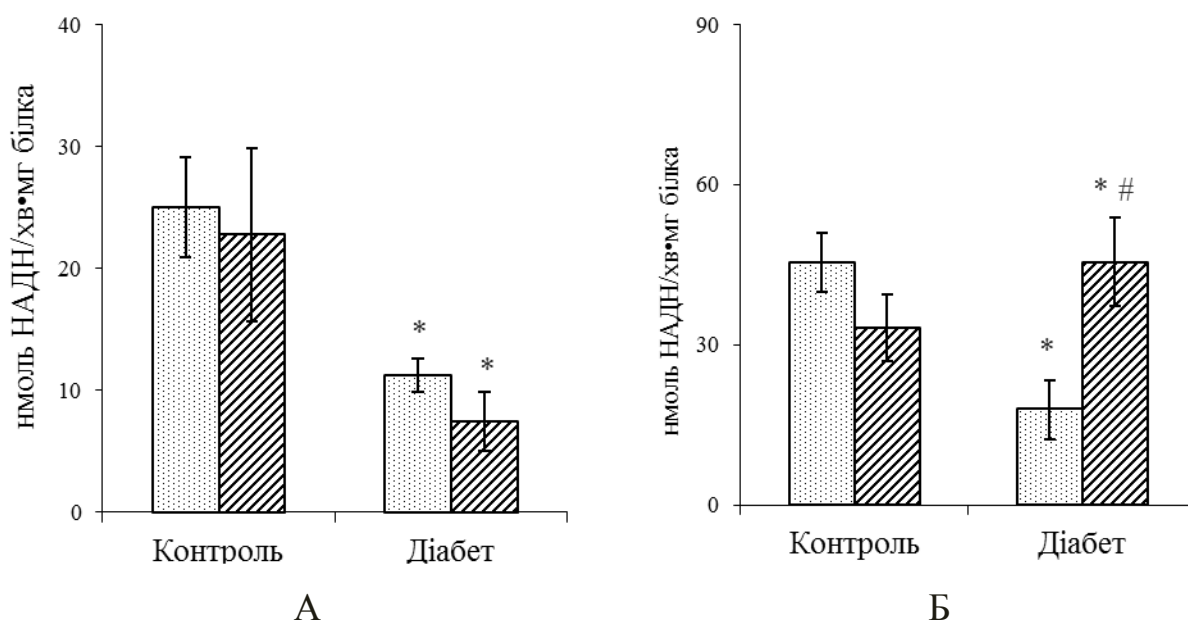


Рис. 4.3.4.5. Глікогенсинтазна активність у клітинах печінки (А) та м'язової тканини (Б) на фоні введення екстракту *P.vulgaris* контрольним щурам та щурам з моделлю ЦД 1 типу, $M \pm m$, $n=10$

▨ – вода, ▩ – екстракт.

* – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Контроль»;

– $p < 0,05$ порівняно з групою щурів «Діабет»

Однак, у той же самий час, ми не спостерігали нормалізації глікогенсинтазної активності у клітинах печінки тварин з моделлю ЦД, які отримували екстракт *P. vulgaris*, що може вказувати на різноспрямований вплив його фітокомпонентів на клітини інсулінзалежних та інсуліннезалежних тканин.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що довготривале пероральне введення водного екстракту лущиння *P. vulgaris* щурам з експериментальною моделлю ЦД 1 типу призводило до збільшення рівня

утилізації глюкози та зростання вмісту GLUT-4 в м'язовій тканині. Такий ефект не супроводжувався зростанням вмісту IP та ТПКазної активності за даних умов. При дослідженні ключових ферментів вуглеводного обміну було зафіксовано підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини та гексокіназної активності у клітинах печінки діабетичних щурів, що свідчить про можливий прямий вплив фітокомпонентів *P. vulgaris* на перебіг інсулінозалежних процесів у клітинах-мішенях інсуліну за умов порушень його продукції β -клітинами в рамках використаної моделі ЦД.

4.4. Дія екстракту *P. vulgaris* на засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою та тирозинпротеїнкіназну активність *in vitro*

Одним з етапів вивчення властивостей екстракту лущиння *P. vulgaris* було дослідити його ефект *in vitro* при безпосередньому додаванні в інкубаційне середовище.

В ході проведеного дослідження утилізації глюкози ізольованою гемідіафрагмою інтактних щурів *in vitro* були використані наступні концентрації екстракту: 0,04, 0,2, 1, 5 мг/мл, в яких екстракт додавали до середовища інкубації за наявності або відсутності інсуліну.

Встановлено, що інсулін в концентрації 0,1 U/мл підвищує рівень утилізації глюкози тканиною у 1,4 рази (рис. 4.4.1).

Додавання екстракту в усіх досліджуваних концентраціях до середовища інкубації без інсуліну не впливало на поглинання глюкози гемідіафрагмою щурів, тобто досліджуваний параметр за даних умов не відрізнявся статистично від базальних значень.

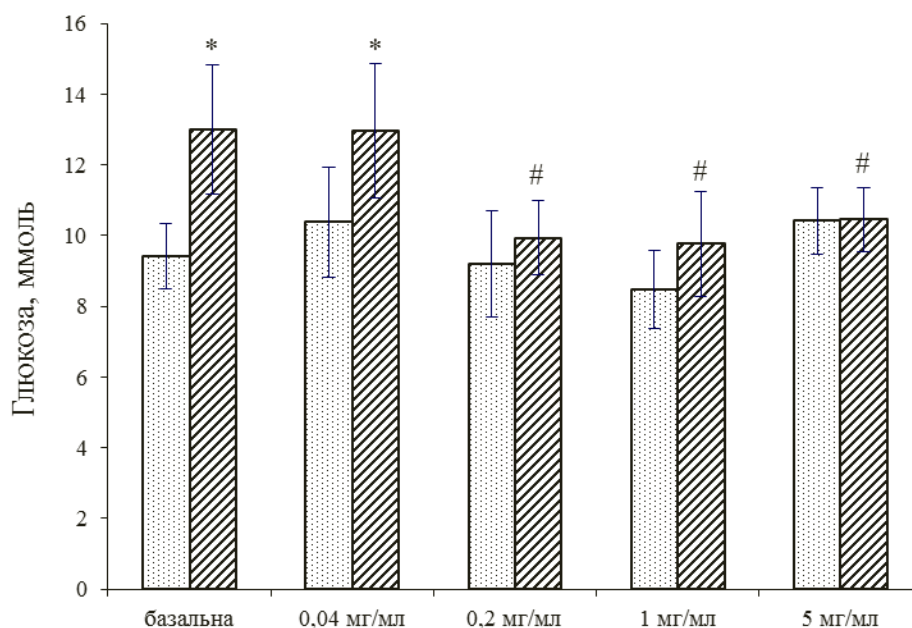


Рис. 4.4.1. Кількість глюкози, засвоєної ізольованою гемідіафрагмою інтактних щурів при додаванні різних концентрацій екстракту *P. vulgaris* до середовища інкубації; $M \pm m$, $n=6$

▨ – без інсуліну, ▨ – з інсуліном.

* – $p < 0,05$ порівняно з базальними значеннями;

– $p < 0,05$ порівняно з дією інсуліну

Показано, що за умов одночасної наявності в середовищі інкубації інсуліну та екстракту *P. vulgaris* концентрацією 0,04 мг/мл величина засвоєння глюкози клітинами гемідіафрагми не відрізнялась від значень за присутності лише інсуліну, тобто ця концентрація екстракту не чинила впливу на здатність інсуліну підвищувати рівень утилізації глюкози гемідіафрагмою. В той же час вищі досліджувані концентрації екстракту інгібували дію гормону на 33%.

Таким чином екстракт *P. vulgaris* не виявляє свою метаболічну дію при безпосередньому його додаванні в інкубаційне середовище, однак збільшує рівень поглинання глюкози гемідіафрагмою щурів після його довготривалого

перорального введення щурам. Отримані результати дозволяють припустити, що екстракт зазнає метаболічної трансформації в шлунково-кишковому тракті або в печінці щурів.

Інгібувальні властивості екстракту (0,1 г/мл) по відношенню до ТПКазної активності ми спостерігали також *in vitro* (рис. 4.4.2.).

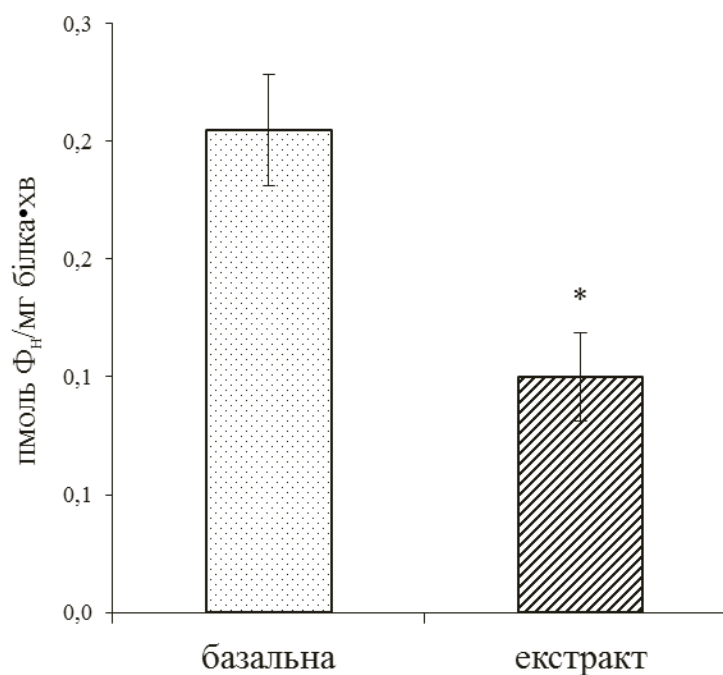


Рис. 4.4.2. Загальна тирозинпротеїнкізна активність у мембранній фракції клітин м'язової тканини інтактних щурів за умов додавання екстракту *P. vulgaris* (0,1 г/мл) до середовища інкубації; $M \pm m$, $n=6$

* – $p < 0,05$ порівняно з базальними значеннями;

Отже, при додаванні екстракту *P. vulgaris* до інкубаційного середовища було зафіксовано зниження у 2 рази показника ТПКазної активності у мембранній фракції клітин м'язової тканини порівняно базальним значенням.

4.5. Хроматографічне розділення екстракту *P. vulgaris* та дослідження антигіперглікемічних властивостей його окремих фракцій

Оскільки при дослідженні ефектів екстракту лушпиння квасолі звичайної були помічені певні побічні ефекти з боку сечо-видільної системи за умов його довготривалого споживання щурами, ми спробували розділити екстракт на окремі фракції з метою подальшого очищення та пошуку активних речовин.

Для фракціонування досліджуваного екстракту *P. vulgaris* нами було застосовано метод гель-фільтрації з використанням сорбенту Сефадекс G 25, який характеризується стабільними фізико-хімічними властивостями та відсутністю неспецифічних взаємодій з компонентами аналіту. З метою максимального збереження компонентного складу окремих фаз екстракту а також виключення можливості потрапляння солей та інших компонентів буферних розчинів в екстракт, рухому фазу було застосовано деонізовану воду з нейтральним рН, у якій також розчиняли сухий екстракт.

У результаті проведених процедур екстракт лушпиння *P. vulgaris* було поділено на дві фракції, які збирали і ліофільно висушували. Показано, що вихід фракції 1 становив 25 %, тоді як для фракції 2 вихід продукту становив 54 % від вихідного екстракту (рис. 4.5.1).

Подальший аналіз отриманих фракцій передбачав дослідження їх біологічних властивостей на здорових щурах, а саме – антигіперглікемічних в ході тесту толерантності до глюкози. Дію окремих фракцій, як і у випадку вихідного сухого екстракту, досліджували в дозі 200 мг/кг.

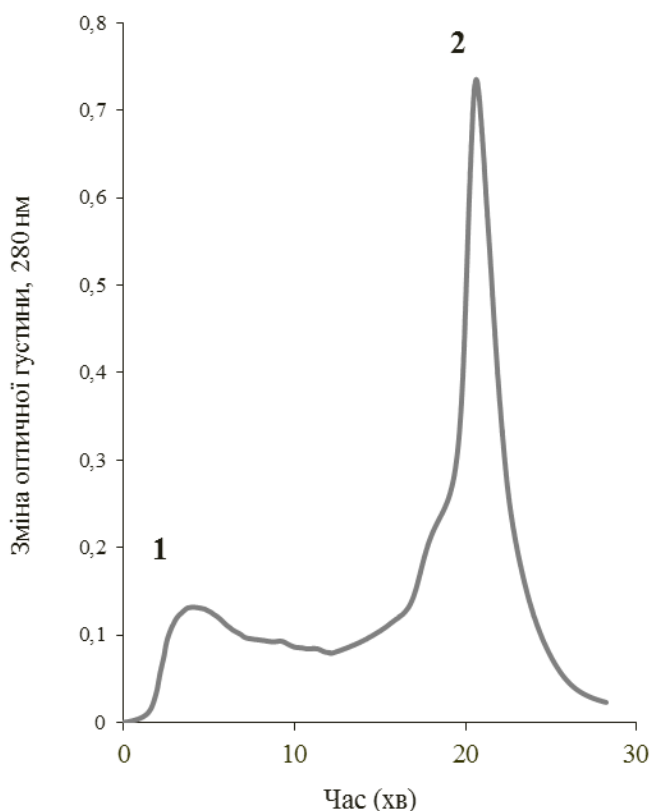


Рис. 4.5.1. Хроматограма розділення екстракту *P. vulgaris* на колонці з Сефадекс G 25

На рисунку 4.5.2 наведено результати скринінгу антигіперглікемічних властивостей водних розчинів окремих фракцій (пік 1 та пік 2) в порівнянні з вихідним екстрактом лушпиння *P. vulgaris* на контрольних щурах.

Згідно глікемічних кривих, наведених на рисунку 4.5.2 показано, що пік 2 виявляв антигіперглікемічну дію, більш виражену порівняно з дією вихідного ліофілізованого екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

В той же час пік 1 не проявляв антигіперглікемічних властивостей, оскільки глікемічна крива за даних умов вірогідно не відрізнялись від кривої контролю.

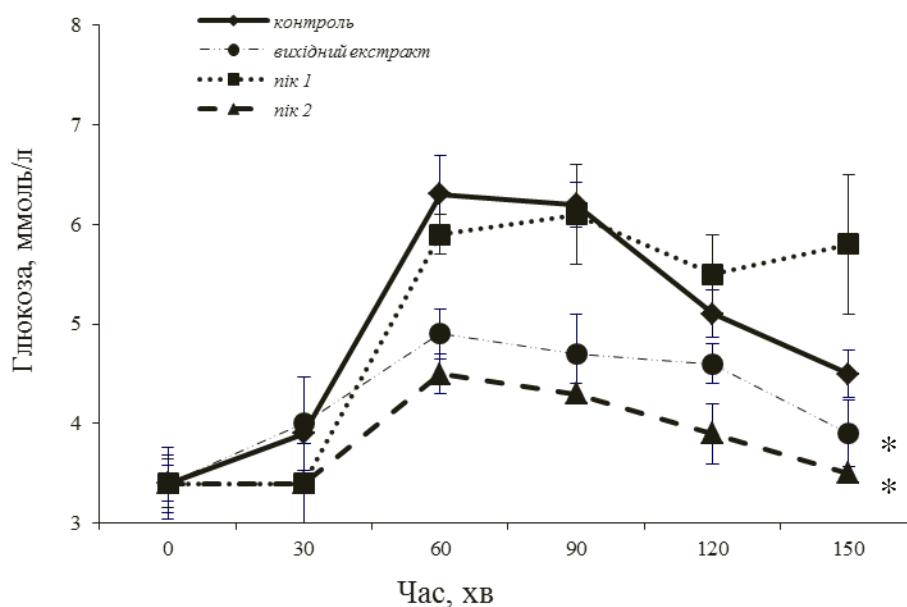


Рис. 4.5.2. Глікемічні криві, отримані в ході глюкозотолерантного тесту, на фоні однократного введення дослідним тваринам екстрактів *P. vulgaris* (200 мг/кг); $M \pm m$, $n=6$

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що ми, можливо, домоглись певного очищення сухого екстракту лущиння *P. vulgaris* шляхом отримання фракції, яка містить біологічно активні фітокомпоненти. Подальше вивчення їх антидіабетичних властивостей є, безумовно, актуальним та логічним продовженням дослідження біологічної дії екстракту лущиння квасолі звичайної за умов ЦД.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Пошук нових підходів у підтримці та лікуванні ЦД залишається актуальним, оскільки дане захворювання характеризується високою поширеністю; причому, щороку кількість хворих на ЦД продовжує зростати. Виникнення і розвиток цієї недуги є причиною патологічних змін усіх фізіологічних систем організму. Одним з можливих шляхів підвищення ефективності лікування ЦД є оптимізація традиційної терапії даного захворювання, що передбачає чергування основних і допоміжних підходів. Як ефективний допоміжний спосіб підтримки та полегшення перебігу ЦД використовують фітотерапію. Крім основних діючих біологічно активних сполук, які мають сприятливу біологічною дію на організм, лікарські рослини містять також супутні речовини, які підсилюють або послаблюють дію основних, що визначає одну з основних відмінностей природних і синтетичних лікарських засобів. Використання фітопрепаратів дозволяє пом'якшити побічну дію токсичних синтетичних лікарських засобів і впливати на всі сторони патогенетичного процесу ЦД, не викликаючи розвитку побічних ефектів. Крім стандартних препаратів, які використовуються для лікування ЦД, в даний час у вітчизняній медичній практиці застосовується велика кількість лікарських рослин, що чинять значний цукрознижувальний ефект.

Однією з таких рослин є квасоля звичайна, відома у народній медицині як ефективний антидіабетичний засіб. Терапевтичні властивості даної сировини були підтверджені експериментально на різних тваринних моделях метаболічних хвороб, в тому числі й ЦД. Стулки плодів квасолі у народній медицині використовують при ревматизмі, набряках ниркового та серцевого походження. Лушпиння квасолі входить до зборів, рекомендованих при лікуванні подагри, сечокам'яної хвороби та циститу. Відвар лушпиння

квасолі корисний при пієлонефриті та гломерулонефриті. Однак, найбільше терапевтичне значення цих відварів у лікуванні ЦД.

Вибір даної сировини для досліджень антидіабетичних властивостей було обґрунтовано в ході нашого попереднього скринінгового дослідження антигіперглікемічних ефектів водних екстрактів рослин, які найчастіше входять до офіційних антидіабетичних монозасобів та зборів: часнику посівного (*Allium sativum*), чорниці звичайної (*Vaccinium myrtillus*), розторопші плямистої (*Silibium marianum*), суниці лісової (*Fragaria vesca*), квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) та кропиви дводомної (*Urtica dioica*). За результатами даного глюкозотолерантного тесту було встановлено, що водний екстракт лушпиння *P. vulgaris* мав найбільш виражену антигіперглікемічну дію.

Зважаючи на популярність відвару лушпиння *P. vulgaris* в лікуванні серед хворого на ЦД населення України, а також на недостатньо однозначні наукові обґрунтування антидіабетичних властивостей даної фітосировини, ми проаналізували метаболічні реакції організму за дії екстракту лушпиння *P. vulgaris* на моделі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів.

З метою точного розрахунку дози екстракту лушпиння *P. vulgaris* в подальших дослідженнях його біологічної дії, за допомогою ліофільного висушування нами було отримано сухий екстракт лушпиння *P. vulgaris*. Антигіперглікемічну дію отриманого сухого екстракту було експериментально підтверджено в дозі 200 мг/кг на рівні свіжоприготовленого настою в ході глюкозотолерантного тесту на здорових щурах.

Під час досліджень терапевтичних властивостей лікарської сировини, вивчення її системної дії на функціональний стан організму в рамках дослідження параметрів гострої токсичності є надзвичайно важливим. При вивченні гострої токсичності екстракту лушпиння *P. vulgaris* при внутрішньошлунковому введенні щурам, навіть при найвищій досліджуваній

дозі – 2000 мг/кг, не було встановлено жодних негативних реакцій з боку організму дослідних щурів, а також загибелі експериментальних тварин. Екстракт лушпиння *P. vulgaris* відноситься до IV класу токсичності – малотоксичних речовин, за класифікацією К.К. Сидорова.

В ході перевірки ефектів одноразового та довготривалого введення екстракту у дозі 200 мг/кг контрольним щурам та тваринам з моделлю стрептозотоцин-індукованого ЦД було виявлено, що екстракт чинив антигіперглікемічну дію за умов як його однократного, так і довготривалого введення контрольним щурам. Рівень же утилізації глюкози ізольованою гемідіафрагмою контрольних щурів зростав лише за умов довготривалого впливу екстракту. У групі діабетичних тварин підвищення глюкозотолерантності тканин до глюкози спостерігали лише за довготривалого введення екстракту. За тих же умов було показано зростання рівня утилізації глюкози клітинами гемідіафрагми.

Ефект довготривалого введення екстракту може реалізуватися за умов достатнього накопичення активних компонентів в організмі або його системної дії на організм. За умов введення екстракту діабетичним щурам відбувалась корекція патологічного стану ЦД, компенсація порушень, викликаних глюкозотоксичністю, як було підтверджено у дослідях з ізольованою гемідіафрагмою, здебільшого внаслідок впливу на периферичні тканини. В той час як в контрольних щурах не були порушені процеси метаболізму глюкози, тому, можливо, саме тому ми спостерігали антигіперглікемічний ефект екстракту лушпиння *P. vulgaris* за умов його як одноразового, так і довготривалого введення, порівняно з діабетичними щурами, для яких даний ефект екстракту мав місце лише після його довготривалого введення.

Згідно отриманих результатів, більш поглиблені дослідження механізмів терапевтичної дії екстракту лушпиння *P. vulgaris* на ключові ланки патогенезу цукрового діабету – порушень вуглеводного обміну, що виявляються станом гіперглікемії, порушення про/антиоксидантного балансу

та імунного статусу, які найчастіше є причиною розвитку та прогресування вторинних ускладнень, було проведено в умовах довготривалого експерименту.

Оскільки маніфестантними ознаками ЦД є поліфагія та полідипсія, нами було досліджено динаміку споживання води та корму контрольними щурами та тваринами з моделлю ЦД впродовж 28-денного введення екстракту. Показано, що впродовж усього терміну дослідження для щурів обох груп з патологією ЦД був характерний стан поліфагії та полідипсії. При чому на останньому тижні експерименту показники споживання корму та води у групі діабетичних щурів, які отримували екстракт *P. vulgaris*, були більшими, порівняно з показниками щурів з моделлю ЦД, які замість екстракту отримували воду.

Досліджуючи зміну маси тіла щурів дослідних груп було встановлено зниження даного показника за умов ЦД, що узгоджується з клінічною картиною даного захворювання для якого характерним є посилена протейнурія та дисліпідемія, зумовлені аберантною дією інсуліну. Натомість, у групі діабетичних щурів, які отримували екстракт *P. vulgaris*, спостерігали зменшення досліджуваних проявів метаболічних порушень, оскільки маса тіла збільшувалась, проте не так виражено як у групах контрольних щурів.

Результати досліджень концентрації глюкози, глікозильованого гемоглобіну та інсуліну в крові дослідних щурів після 28-денного введення екстракту засвідчили, що екстракт лушпиння *P. vulgaris* мав виражений гіпоглікемічний ефект у діабетичних щурів. Проте повної нормалізації рівня глюкози внаслідок дії екстракту в крові діабетичних щурів не спостерігалось що може обумовлювати все ж високі показники концентрації глікозильованого гемоглобіну у тварин даної групи. Не було відмічено інсулінотропної дії екстракту за умов ЦД.

Довготривала гіперглікемія є причиною супутніх вторинних метаболічних ускладнень, які можуть сприяти дисфункції різних органів. Такі органи як печінка та нирки є особливо вразливими за умов розвитку та

прогресування ЦД, оскільки порушення їх функціонування часто спостерігається як результат діабетичних ускладнень.

Збільшення маси печінки та нирок спостерігали у щурів із змодельованим ЦД. У контрольних та діабетичних щурів, які отримували екстракт, також спостерігалась тенденція до збільшення печінки та нирок, що може свідчити про певне метаболічне навантаження на ці органи.

Про функціональний стан організму у щурів досліджуваних груп судили також за змінами ключових біохімічних показників сироватки крові. Показано, що за умов довготривалого споживання екстракту діабетичними щурами, спостерігали нормалізацію біохімічних показників функціонального стану печінки. Однак сироваткові біохімічні показники, які відображають функціональний стан нирок, свідчать про певне метаболічне навантаження на даний орган за умов впливу екстракту *P. vulgaris*. Можливо такий метаболічний вплив екстракту пов'язаний з тим, що лушпиння квасолі в народній медицині використовують як діуретичний та протинабряковий засіб.

Одним із ускладнень, які часто супроводжують прогресування ЦД, є окиснювальний стрес. На підставі отриманих результатів встановлено, що введення екстракту лушпиння квасолі діабетичним щурам призводило до поліпшення показників прооксидантно-антиоксидантного статусу у печінці та нирках. Оскільки за даних умов мало місце зниження вмісту продуктів ПОЛ на фоні нормалізації активності ферментів антиоксидантного захисту в цих органах.

Зазвичай неконтрольовані запальні та імунні реакції супроводжують патогенез ЦД 1 типу та можуть призводити до інфільтрації інсулінопродукуючих β -клітин, активуючи в них апоптичні процеси, а також порушення гормон-рецепторної взаємодії на рівні IP. Аналізуючи вищезазначені результати, ми констатували, що довготривале введення водного екстракту лушпиння квасолі щурам з моделлю ЦД, окрім поліпшення стану системи АОЗ, чинить також сприятливу дію на імунні

процеси за умов ЦД. За даних умов було встановлено зниження рівня прозапального IL-1 β та рівня Ig класу G у групі діабетичних щурів та виражене зростання рівня протизапальних цитокінів.

Оскільки гіпоглікемічні властивості екстракту *P. vulgaris* не пов'язані з посиленням секреції інсуліну, ми припустили, що цукрознижувальний ефект може бути наслідком прямого його впливу на периферичні тканини, залучені до внутрішньоклітинної утилізації глюкози.

Початковою ланкою внутрішньоклітинного інсулінового каскаду є тирозинкіназа інсулінового рецептора. Встановлено, що загальна мембранозв'язана ТПКазна активність у клітинах м'язової тканини діабетичних щурів була нижчою, порівняно зі значеннями контрольної групи. Однак на фоні довготривалого введення досліджуваного екстракту як контрольним щурам, так і тваринам з моделлю ЦД, ми спостерігали ще більш виражене зниження цього показника. Встановлено, що зниження ТПКазної активності не пов'язане зі зменшенням вмісту інсулінового рецептора в мембранній фракції клітин м'язової тканини, оскільки нами не було встановлено вірогідних відмінностей даного параметру в межах досліджуваних груп щурів. Цікаво, що інгібувальні властивості екстракту по відношенню до ТПКазної активності спостерігали також *in vitro*.

У клітинах інсулінозалежних тканин інсулін збільшує швидкість надходження глюкози за рахунок активації транслокації білка-переносника глюкози GLUT-4. Показано, що у групі діабетичних щурів, загальний вміст білка GLUT-4 був знижений, порівняно з контролем, що може бути зумовлено тривалим станом гіпоінсулінемії. За умов довготривалого введення екстракту спостерігали збільшення загального вмісту GLUT-4 як у групі діабетичних так і контрольних щурів, що може вказувати на здатність певних фітокомпонентів екстракту впливати на експресію гену GLUT-4, призводячи до зростання загального вмісту даного білка.

Відомо, що після надходження глюкози в клітини периферичних тканин глюкоза зазнає фосфорилування внаслідок гексокіназної реакції. Відомо, що

за умов ЦД 1 типу, окрім м'язової тканини, порушення інсулінового сигналу яскраво відображається і в печінці – зокрема на рівні синтезу глікогену, інгібування процесів глікогонеогенезу.

При дослідженні ключових ферментів вуглеводного обміну у щурів з моделлю ЦД 1 типу за умов введення екстракту було зафіксовано підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини та гексокіназної активності у клітинах печінки діабетичних щурів, що свідчить про можливий прямий вплив фітокомпонентів *P. vulgaris* на перебіг інсулінозалежних процесів у клітинах-мішенях гормону за умов порушень його продукції β -клітинами в рамках використаної моделі ЦД.

Оскільки при дослідженні ефектів сухого екстракту лушпиння квасолі звичайної були помічені певні побічні ефекти з боку сечо-видільної системи за умов його довготривалого споживання щурами, ми спробували розділити екстракт на окремі фракції з метою подальшого очищення та пошуку активних речовин. У результаті проведених процедур екстракт лушпиння квасолі було поділено на дві фракції, які збирали і ліофільно висушували.

В ході проведення дослідження біологічних властивостей отриманих фракцій в дозі 200 мг/кг на здорових щурах, а саме – антигіперглікемічних в ході тесту толерантності до глюкози було встановлено, що лише одна фракція виявляла антигіперглікемічну активність, яка була більш вираженою порівняно з ефектом вихідного екстракту лушпиння *P. vulgaris*. Натомість високомолекулярна фракція не виявляла антигіперглікемічні властивості.

На основі результатів проведеної роботи можна стверджувати, що антидіабетична дія екстракту лушпиння *P. vulgaris* є різнонаправленою. Препарати на основі цього екстракту можуть бути перспективними при лікуванні цукрового діабету як 1-го та 2-го типу, оскільки в даній роботі було продемонстровано позитивний його вплив на периферичні глюкозоутилізуючі тканини, а також і на ускладнення ЦД, зважаючи на відмінні антиоксидантні та імуномодулюючі властивості екстракту лушпиння *P. vulgaris*, що є особливо актуальним.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети проведено комплексне дослідження біологічних ефектів сухого екстракту лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) та підтверджено його ефективну антидіабетичну дію. Отримані результати обґрунтовують доцільність використання даної фітосировини у медичній практиці для терапії цукрового діабету та його ускладнень.

1. Встановлено, що екстракт лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) мав найвираженіший антигіперглікемічний ефект серед досліджуваних представників вітчизняної флори. Отримано сухий екстракт лушпиння квасолі звичайної та доведено його гіпоглікемічну дію за концентрації 200 мг/кг маси тіла.

2. Застосування екстракту лушпиння квасолі звичайної за умов цукрового діабету 1 типу призводило до зниження концентрації глюкози у 2,5 рази та рівня глікозильованого гемоглобіну на 20%. Не виключено, що ефект екстракту не обумовлений його інсулінотропними властивостями.

3. Показано, що за умов введення екстракту лушпиння квасолі звичайної щурам з моделлю цукрового діабету 1 типу рівень засвоєння глюкози ізольованою гемідіафрагмою збільшувався на 80%, що може бути обумовлено зростанням вмісту глюкозного транспортеру GLUT-4 на 45% в м'язовій тканині. Виявлено, що введення екстракту лушпиння квасолі звичайної позитивно впливало на процеси внутрішньоклітинного метаболізму глюкози у печінці та м'язовій тканині щурів з моделлю цукрового діабету 1 типу: зростала гексокіназна активність в печінці у 1,6 рази та глікогенсинтазна активність у м'язовій тканині у 2,5 рази. За умов впливу екстракту не було встановлено змін вмісту інсулінового рецептора в мембранній фракції кітин м'язової тканини, однак мав місце виражений інгібуючий вплив екстракту на мембранозв'язану тирозинкіназну активність

клітин м'язової тканини як контрольних щурів у 2,2 рази так і тварин за ЦД у 1,2 рази.

4. Екстракт лушпиння квасолі звичайної нормалізував прооксидантно-антиоксидантний баланс за умов цукрового діабету 1 типу. Вміст продуктів ліпопероксидації МДА та ШО у печінці був знижений на 20 %, а ДК – на 30 %; у нирках вміст ДК і ШО був знижений на 30%, а МДА – на 20 %, відповідно. Активність СОД та каталази була вищою у печінці у 2 та 1,8 рази; тоді як у нирках активність СОД була вищою у 1,8 рази, а каталази у 2,6 рази меншою за умов введення екстракту. Показано зростання активності ГП та ГТ відповідно на 20 та 30 % у печінці; на 20 % та у 2 рази у нирках щурів за ЦД 1 типу.

5. Екстракт лушпиння квасолі звичайної мав виражений протизапальний ефект, про що свідчить зниження вмісту імуноглобулінів класу G у 2,2 рази та зростання рівня протизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 відповідно на 40 та 80 % у сироватці крові щурів за ЦД 1 типу.

6. Виявлено, що екстракт лушпиння квасолі звичайної проявляв антидіабетичну дію, зокрема: позитивно впливав на динаміку зміни маси тіла діабетичних щурів, нормалізував ключові біохімічні показники сироватки крові (АЛТ, АСТ, ГГТ, холестеролу, ЛПВЩ). Встановлено посилення споживання води щурами з ЦД 1 типу на фоні прийому екстракту, та відхилення від норми таких сироваткових біохімічних показників як креатинін та сечовина, що може свідчити про порушення функції нирок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. World Health Organization and diabetes [Електронний ресурс] / World Health Organization // WHO Fact sheet. – 2016. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
2. Антощук Р.Я. Цукровий діабет: етіологія захворювання / Р.Я. Антощук // Молодий вчений. – 2016. – Т. 33, № 6. – С. 277 – 280.
3. Khan V.N. Pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential / V.N. Khan, A.K. Najmi, M. Akhtar // J. Pharm. Bioallied. Sci. – 2012. – Vol. 4, №1. – P. 27–42.
4. Helmstädter A. J. Beans and diabetes: *Phaseolus vulgaris* preparations as antihyperglycemic agents / A.J. Helmstädter. // J. Med. Food. – 2010. – Vol. 13, № 2. – С. 251–254.
5. Barrett M.L. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control / M.L. Barrett, J.K. Udani // Nutr. J. – 2011. – Vol. 17;10, № 24. – doi: 10.1186/1475-2891-10-24.
6. Luka C.D. Effect of Aqueous Extract of *Phaseolus vulgaris* L. (Red Kidney Beans) on Alloxan-induced Diabetic Wistar Rats / C.D. Luka, A. Olatunde, H. Tijjani [et al.] // Int. J. Sci. Inv. Tod. – 2013. – Vol. 2, №4. – P. 292-301.
7. Рибак В.А. Експериментальне визначення токсикологічних властивостей, ульцерогенної та місцевопоздразнюючої дії густого екстракту квасолі / В.А. Рибак, Л.М. Малоштан, О.В. Павиченко // Світ медицини та біології. – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 107 – 112.
8. Рибак В.А. Вплив тривалого застосування густого екстракту квасолі на показники вуглеводного обміну в щурів з метаболічним синдромом на тлі ожиріння / В.А. Рибак, Л.М. Малоштан // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – Т. 40, № 4–5. – С. 80 – 84.

9. Pari L. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes / L. Pari, S. Venkateswaran // *Pharmazie*. – 2003. – Vol. 58. – P. 916-919.
10. Lin Y. Current views on type 2 diabetes / Y. Lin, Z. Sun // *J. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 204. – P. 1–11.
11. Ichinose K. Recent Advancement of Understanding Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Potential Relevance to Diabetic Nephropathy / K. Ichinose, E. Kawasaki, K. Eguchi // *Am. J. Nephrol.* – 2007. – Vol. 27, № 6. – P. 554-564.
12. Suarez-Pinzon W.L. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits / W.L. Suarez-Pinzon, A. Rabinovitch // *Int. J. Exp. Diabetes. Res.* – 2001. – Vol. 2, № 1. – P. 3-17.
13. Pearl-Yafe M. Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors / M. Pearl-Yafe, A. Kaminitz, E.S. Yolcu [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13. – P. 749-760.
14. Mehmeti I. Induction of the intrinsic apoptosis pathway in insulin-secreting cells is dependent on oxidative damage of mitochondria but independent of caspase-12 activation / I. Mehmeti, E. Gurgul-Convey, S. Lenzen [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813, № 10. – P. 1827-1835.
15. Christen U. Enterovirus infection of human beta-cells activates dendritic cells and triggers antiviral responses: are enteroviruses convicted now ? // U. Christen // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59. – P. 1126-1128.
16. Vaseghi H. Th1/Th2 cytokines in Type 1 diabetes: Relation to duration of disease and gender / H. Vaseghi, Z. Jadali // *Indian. J. Endocrinol. Metab.* – 2016. – Vol. 20, № 3. – P. 312-316.
17. DiLorenzo T.P. During the early prediabetic period in NOD mice, the pathogenic CD8(+) T-cell population comprises multiple antigenic specificities / T.P. DiLorenzo, S.M. Lieberman, T. Takaki [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2002. – Vol. 105, № 3. – P. 332-341.

18. Padgett L.E. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis / L.E. Padgett, K.A. Broniowska, P.A. Hansen [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 1281, № 1. – P. 16-35.
19. Leigh A. Protection of NIT-1 Pancreatic β -Cells From Immune Attack by Inhibition of NF- κ B / A. Leigh, A. Stephens, E. Helen [et al.] // *J. Autoimmun.* – 1997. – Vol. 10, № 3. – P. 293-298.
20. Wong F.S. Activation of insulin-reactive CD8 T-cells for development of autoimmune diabetes / F.S. Wong // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58. – P. 1156–1164.
21. Wang B. The role of CD8⁺T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus / B. Wang // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – Vol. 26. – P. 1762–1769.
22. Podack E.R. Function of granule perforin and esterases in T cell-mediated reactions. Components required for delivery of molecules to target cells / E.R. Podack // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1988. – Vol. 532. – P. 292–302.
23. Cantor J. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1 / J. Cantor, K. Haskins // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 5760–5767.
24. Nicoletti F. The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon-gamma receptor on the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse / F. Nicoletti // *Endocrinology.* – 1996. – Vol. 137. – P. 5567–5575.
25. Varsha M. K. Vitamin K1 alleviates streptozotocin-induced type 1 diabetes by mitigating free radical stress, as well as inhibiting NF- κ B activation and iNOS expression in rat pancreas / M.K. Varsha, R. Thiagarajan, R. Manikandan [et al.] // *Nutrition.* – 2015. – Vol. 31, № 1. – P. 214-422.
26. Pankewycz O.G. Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications / O.G. Pankewycz, J.X. Guan, J.F. Benedict // *Endocr. Rev.* – 1995. – Vol. 16, № 2. – P. 164–76.
27. Khan M.W. Detection of autoantibodies against reactive oxygen species modified glutamic acid decarboxylase-65 in type 1 diabetes associated

complications / M.W. Khan, K. Banga, N. Subhash [et al.] // *BMC. Immunol.* - 2011. – Vol. 12, № 19. – doi: 10.1186/1471-2172-12-19.

28. Pirot P. Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs / P. Pirot, N. Naamane, F. Libert [et al.] // *Diabetologia.* – 2007. – Vol. 50, № 5. – P. 1006–1014.

29. Chen Q. JNK/PI3K/Akt signaling pathway is involved in myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: effects of salvianolic acid A intervention / Q. Chen, T. Xu, D. Li [et al.]// *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – Vol. 8, № 6. – P. 2534-2548.

30. Kang S. Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders / S. Kang, R. Dahl, W. Hsieh [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 29, № 10. – P. 5185-98.

31. Davies M.G. New Insights on the Role of SERCA During Vessel Remodeling in Metabolic Syndrome / M.G. Davies // *Diabetes.* – 2015. –Vol. 64, № 9. – P. 3066-3068.

32. Waller A.P. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump is a major regulator of glucose transport in the healthy and diabetic heart / A.P. Waller, A. Kalyanasundaram, S. Hayes [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1852, № 5. – P. 873-881.

33. Weir G.C. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes / G.C. Weir, D.R. Laybutt, H. Kaneto [et al] // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 154–159.

34. Zhou Y.P. Overexpression of repressive cAMP response element modulators in high glucose and fatty acid-treated rat islets. A common mechanism for glucose toxicity and lipotoxicity? / Y.P. Zhou, K. Marlen, J.F. Palma [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 51. – P. 51316–51323.

35. Fu Z. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes / Z. Fu, E.R. Gilbert, D. Liu // *Curr. Diabetes. Rev.* – 2013. – Vol. 9, № 1. – P. 25–53.
36. Robertson R.P. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection / R.P. Robertson, J. Harmon, P.O. Tran [et al.] // *Diabetes.* – 2003 – Vol. 52, № 3. – P. 581–587.
37. Im K.H. In Vitro Antioxidant, Anti-Diabetes, Anti-Dementia, and Inflammation Inhibitory Effect of *Trametes pubescens* Fruiting Body Extracts / K.H. Im, T.K. Nguyen, J. Choi [et al.] // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21, № 5. – doi: 10.3390/molecules21050639.
38. Lightfoot Y.L. Immunemediated β -cell death in type 1 diabetes: lessons from human β -cell lines / Y.L. Lightfoot, J. Chen, C.E. Mathews. // *Eur. J. Clin. Invest.* - 2012. – Vol. 42. – P. 1244–1251.
39. Mandrup-Poulsen T. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans / T. Mandrup-Poulsen // *Allergy.* – 1985. – Vol. 40. – P. 424–429.
40. Nerup J. Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type I diabetes / J. Nerup // *Diabetes Care.* – 1988. – Vol. 11. – P. 16–23.
41. Thivolet C. CD8⁺ T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4⁺ T cell-dependent / C. Thivolet // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146. – P. 85–88.
42. Wallet M.A. Type 1 diabetes, inflammation and dendritic cells / M.A. Wallet, R. Tisch // *Drug. Discov. Today.* – 2006. – Vol. 3, № 3. – P. 373–379.
43. Poitout V. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity / V. Poitout, R.P. Robertson // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143, № 2. – P. 339–342.
44. Khaldi M.Z. Increased glucose sensitivity of both triggering and amplifying pathways of insulin secretion in rat islets cultured for 1 wk in high glucose / M.Z. Khaldi, Y. Guiot, P. Gilon [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 287, № 2. – P. 207–217.

45. Solanki J.D. Is the peripheral arterial disease in low risk type 2 diabetic patients influenced by body mass index, lipidemic control, and statins? / J.D. Solanki, A.H. Makwana, H.B. Mehta [et al.] // *J. Pharmacol Pharmacother.* – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 87-92.
46. Jayashankar C.A. Serum uric acid and low-density lipoprotein cholesterol levels are independent predictors of coronary artery disease in Asian Indian patients with type 2 diabetes mellitus / C.A. Jayashankar, H.P. Andrews, V.B. Pinnelli [et al.] // *J. Nat. Sci. Biol. Med.* – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 161-165.
47. Jali M.V. Familial early onset of type-2 diabetes mellitus and its complications / M.V. Jali, S. Kamar, S.M. Jali [et al.] // *N. Am. J. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 1, № 7. – P. 377–380.
48. Johnson D.G. New pharmacologic approaches to the treatment of diabetes / D.G. Johnson, R. Bressler // *Spec. Top. Endocrinol. Metab.* – 1984. – Vol. 6. – P. 163-192.
49. Maedler K. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets / K. Maedler, P. Sergeev, F. Ris [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110, № 6. – P. 851–860.
50. Ohara-Imaizumi M. The cytokine interleukin-1 beta reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic beta-cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis / M. Ohara-Imaizumi, A.K. Cardozo, T. Kikuta [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 40. – P. 41271–41274.
51. Tajiri Y. Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits β -cell function / Y. Tajiri, C. Moller, V. Grill // *Endocrinology.* – 1997. – Vol. 138, № 1. – P. 273–280.
52. Kajimoto Y. Induction of glycation suppresses glucokinase gene expression in HIT-T15 cells / Y. Kajimoto, T. Matsuoka, H. Kaneto [et al.] // *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42, № 121. – P. 417–424.
53. Matsuoka T. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells / T. Matsuoka,

Y. Kajimoto, H. Watada [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99, № 1. – P. 144–150.

54. Gurgul E. Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines / E. Gurgul, S. Lortz, M. Tiedge [et al.] // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53, № 9. – P. 2271–2280.

55. Cnop M. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities / M. Cnop, N. Welsh, J.C. Jonas [et al.] // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54, № 2. – P. 97-107.

56. Rhodes C.J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? / C.J. Rhodes // *Science.* – 2005. – Vol. 307, № 5708. – P. 380–384.

57. Wu J. Sources and implications of NADH/NAD(+) redox imbalance in diabetes and its complications / J. Wu, Z. Jin, H. Zheng [et al.] // *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* – 2016. – Vol. 10, № 9. – P. 145-153.

58. Zakrevskii A.A. Status of the antioxidant system and sorbitol pathway of glucose metabolism in diabetes mellitus / A.A. Zakrevskii, L.F. Osinskaia, T.K. Znamenskaia [et al.] // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 1993. – Vol. 65, № 2. – P. 103-107.

59. Yagihashi S. Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor / S. Yagihashi, S.I. Yamagishi, R.R. Wada [et al.] // *Brain.* – 2001. – Vol. 124, № 12. – P. 2448-2458.

60. Trifunovic A. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing / A. Trifunovic, N.G. Larsson // *J. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 263, № 2. – P. 167–178.

61. Grankvist K. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse / K. Grankvist, S.L. Marklund, I.B. Taljedal // *Biochem. J.* – 1981. – Vol. 199, № 2. – P. 393–398.

62. Poitout V. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell / V. Poitout, J. Amyot, M. Semache [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1801, № 3. – P. 289-298.

63. Poitout V. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction / V. Poitout, R.P. Robertson // *Endocr. Rev.* – 2008. – Vol. 29, № 3. – P. 351–66.
64. Pietropaolo M. Pathogenesis of diabetes: our current understanding / M. Pietropaolo, D. Le Roith // *Clin. Cornerstone.* – 2001. – Vol. 4, № 2. – P. 1–16.
65. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM / G. Boden // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46, № 1. – P. 3–10.
66. Prentki M. Islet beta cell failure in type 2 diabetes / M. Prentki, C.J. Nolan // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, № 7. – P. 1802–1812.
67. Abranches M.V. Obesity and diabetes: the link between adipose tissue dysfunction and glucose homeostasis / M.V. Abranches, F.C. Oliveira, L.L. Conceicao [et al.] // *Nutr. Res. Rev.* – 2015. – Vol. 28, № 2. – P. 121-132.
68. Martinez S.C. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis / S.C. Martinez, K. Tanabe, C. [et al.] // *Diabetes.* – 2008. – Vol. 57, № 4. – P. 846–859.
69. Kharroubi I. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta cell apoptosis by different mechanisms: role of NF-kappa B and endoplasmic reticulum stress / I. Kharroubi, L. Ladriere, A.K. Cardozo [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145, № 11. – P. 5087-5096.
70. Reaven G.M. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance / G.M. Reaven, C.B. Hollenbeck, Y.D.I. Chen // *Diabetologia.* – 1989. – Vol. 32. – P. 52-55.
71. Sharp P.S. Changes in insulin resistance with long-term insulin therapy / P.S. Sharp, V. Mohan, F. Vitelli [et al.] // *Diabetes Care* – 1987. – Vol. 10. – P. 56–61.
72. Rossetti L. Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats / L. Rossetti, G.I. Shulman, W. Zawalich [et al.] // *J Clin Invest.* – 1987. – Vol. 80. – P. 1037–1044.
73. Hales C.N. The pathogenesis of NIDDM / C.N. Hales // *Diabetologia.* – 1994. – Vol. 37. – P. 162-168.

74. Vuorinen-Markkola H. Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type 1 diabetic patients / H. Vuorinen-Markkola, V.A. Koivisto, H. Yki-Jrvinen // *Diabetes*. – 1992. – Vol. 41. – P. 571-580.
75. Golay A. Metabolic basis of obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus / A. Golay, J.P. Felber, E. Jequier [et al.] // *Diabetes. Metab. Rev.* – 1988. – Vol. 4. – P. 727-747.
76. Pessin J.E. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance / J.E. Pessin, A.R. Saltiel // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 106. – P. 165-169.
77. Shulman G.I. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy / G.I. Shulman // *Physiology*. – 2004. – Vol. 19, № 4. – P. 183-190.
78. Peppas M. Skeletal muscle insulin resistance in endocrine disease / M. Peppas, C. Koliaki, P. Nikolopoulos // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 15. – doi: 10.1155/2010/527850.
79. Aytug S. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes / S. Aytug, D. Reich, L.E. Sapiro // *Hepatology*. – 2003. – Vol. 38, № 6. – P. 1384-92.
80. Garvey W. T. Normal physiology of insulin action. *International Textbook of Diabetes Mellitus*; Ed. by R.A. DeFronzo et al. / W. T. Garvey. – New York: John Wiley & Sons, 2004. – P. 227.
81. Virkamäki A. Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance / A. Virkamäki, K. Ueki, C.R. Kahn // *J. Clin. Investigation*. – 1999. – Vol. 103, № 7. – P. 931 – 943.
82. Bergman R.N. Insulin Resistance: Insulin Action and Its Disturbances in Disease / R.N. Bergman // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 2201-2209.
83. Bloomgarden Z.T. Concepts of insulin resistance / Z.T. Bloomgarden // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* – 2005. – Vol. 3, № 4. – P. 284-293.

84. Withers D.J. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice / D.J. Withers, J.S. Gutierrez, H. Towery [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 391, № 6670. – P. 900–904.
85. Bruning J.C. Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells / J.C. Bruning, J. Winnay, B. Cheatham [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 1997. - Vol. 17, № 3. – P. 1513–1521.
86. Kido Y. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2 / Y. Kido, D.J. Burks, D. Withers // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 105. – P. 199-205.
87. Qiao L.Y. Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance / L.Y. Qiao, J.L. Goldberg, J.C. Russell [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 10625-10632.
88. White M.F. Insulin signaling in health and disease / M.F. White // *Science*. – 2003. – Vol. 302. – P. 1710-1711.
89. Shah O.J. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies / O.J. Shah, Z. Wang, T. Hunter // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 1650-1656
90. Chen Y. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle / Y. Chen, G.W. Cline, D. Zhang // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 50230-50236
91. Morino K. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents / K. Morino, K.F. Petersen, S. Dufour // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 3587-3593.
92. Mori H. Critical roles for the TSC-mTOR pathway in β -cell function / H. Mori, K. Inoki, D. Opland [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 297, № 5. – P. 1013-1022.
93. Aguirre V. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action /

V. Aguirre, E.D. Werner, J. Giraud [et al] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 1531-1537.

94. Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism / A.R. Saltiel, C.R. Kahn // Nature. – 2001. – Vol. 414. – P. 799-806.

95. Yu C. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle / C. Yu, Y. Chen, G.W. Cline [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 50230-50236

96. Li J. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway / J. Li, K. DeFea, R.A. Roth // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 9351-9356.

97. Cho H. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice / H. Cho, J.L. Thorvaldsen, Q. Chu // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 38349-38352

98. Cho H. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta) / H. Cho, J. Mu, J.K. Kim [et al.] // Science. – 2001. – Vol. 292. – P. 1728-1731.

99. Hall R.K. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. / R.K. Hall, T. Yamasaki, T. Kucera, M. Waltner-Law, R. O'Brien, D.K. Granner // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 30169-30175.

100. Schmoll D. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B-alpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity / D. Schmoll, K.S. Walker, D.R. Alessi // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 36324-36333.

101. Kim-Muller J.Y. FoxO1 Deacetylation Decreases Fatty Acid Oxidation in β -Cells and Sustains Insulin Secretion in Diabetes / J.Y. Kim-Muller, Y.J. Kim, J. Fan // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. – 91, № 9. – P. 10162-10172.

102. Wende A.R. Enhanced cardiac Akt/protein kinase B signaling contributes to pathological cardiac hypertrophy in part by impairing mitochondrial function via transcriptional repression of mitochondrion-targeted nuclear genes / A.R. Wende, B.T. O'Neill, H. Bugger // *Mol. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 35. – P. 831-846.
103. Kirwan J. Reversal of insulin resistance postpartum is linked to enhanced skeletal muscle insulin signaling / J. Kirwan, A. Varastehpour, M. Jing [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 89. – P. 4678-4684.
104. Morino K. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction / K. Morino, K.F. Petersen, G.I. Shulman // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55, № 2. – P. 9-15.
105. Newton A.C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm / A.C. Newton // *Biochem. J.* – 2003. – P. 370. – P. 361-371.
106. Boden G. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction / G. Boden, G.I. Shulman // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 32, № 3. – P. 14-23.
107. Itani S.I. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α / S.I. Itani, N.B. Ruderman, F. Schmedder [et al.] // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51. – P. 2005-2011.
108. Toker A. Cellular signaling: pivoting around PDK-1 / A. Toker, A.C. Newton // *Cell.* – 2000. – Vol. 103. – P. 185-188.
109. Dey D. Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling / D. Dey, D. Basu, S.S. Roy // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 246. – P. 60-64.
110. Dey D. Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein / D. Dey, M. Mukherjee, D. Basu // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2005. – Vol. 16. – P. 217-228.

111. Michael L.F. Restoration of insulinsensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1 / L.F. Michael, Z. Wu, R.B. Cheatham // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P.3820-3825.
112. Yoon J.C. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 / J.C. Yoon, P. Puigserver, G. Chen // *Nature.* – 2001. – Vol. 413. – P.131-138.
113. Herzig S. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1 / S. Herzig, F. Long, U.S. Jhala [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 413. – P. 179-183.
114. Furukawa N. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis / N. Furukawa, P. Ongusaha, W.J. Jahng // *Cell. Metab.* – 2005. – Vol. 2. – P. 119-129.
115. DiMauro S. Mitochondrial respiratory-chain diseases / S. DiMauro, E.A. Schon // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348. – P. 2656-2668.
116. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus / V. Saini // *World. J. Diabetes.* – 2010. - Vol 1, № 3. – P. 68-75.
117. Nokoff N.J. The Interplay of Autoimmunity and Insulin Resistance in Type 1 Diabetes / N. Nokoff, M. Rewers, M. Cree // *Green. Discov. Med.* – 2012. – Vol. 13, № 69. – P. 115-122.
118. Lamb M.M. Height growth velocity, islet autoimmunity and type 1 diabetes development: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. / M.M. Lamb, X. Yin, G.O. Zerbe [et al.] // *Diabetologia.* – 2009. – Vol. 52, № 10. – P. 2064-2071.
119. Vuorinen-Markkola H. Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type I diabetic patients / H. Vuorinen-Markkola, V.A. Koivisto, H. Yki-Jarvinen // *Diabetes.* – 1992. – Vol. 41, № 5. – P. 571-580.

120. Yki-Jarvinen H. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes / H. Yki-Jarvinen, E. Helve, V.A. Koivisto // *Diabetes*. – 1987. – Vol. 36, № 8. – P. 892-896.
121. DeFronzo R.A. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview / R.A. DeFronzo, R.C. Bonadonna, E. Ferrannini // *Diabetes Care*. – 1992. – Vol. 15, № 3. – P. 318-368.
122. DeFronzo R.A. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus / R.A. DeFronzo, D. Simonson, E. Ferrannini // *Diabetologia* – 1982. – Vol. 23, № 4. – P. 313-319.
123. Cline G.W. Mechanism of impaired insulin-stimulated muscle glucose metabolism in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus / G.W. Cline, I. Magnusson, D.L. Rothman [et al] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99, № 9. – P. 2219-2224.
124. A.S. Deshmukh Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle / A.S. Deshmukh // *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 13-24.
125. Kahn B.B. Expression of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle of humans with insulin-dependent diabetes mellitus: regulatory effects of metabolic factors / B.B. Kahn, A.S. Rosen, J.F. Bak // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1992. – Vol. 74, № 5. – P. 1101-1109.
126. Cree M.G. Postburn trauma insulin resistance and fat metabolism / M.G. Cree, R.R. Wolfe // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 94, № 1. – P. 1-9.
127. Okamoto M.M. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver / M.M. Okamoto, G.F. Anhô, R. Sabino-Silva [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2011. – Vol. 211, № 1. – P. 55-64.

128. Haffar T. Impaired fatty acid oxidation as a cause for lipotoxicity in cardiomyocytes / T. Haffar, F. Berube-Simard, N. Bousette // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 468, № 1-2. – P. 73-78.
129. Mottillo E.P. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function / E.P. Mottillo, E.M. Desjardins, J.D. Crane [et al.] // *Cell. Metab.* – 2016. – Vol. 24, № 1. – P. 18-29.
130. O'Brien R.M. Insulin-regulated gene expression / R.M. O'Brien, R.S. Streeper, J.E. Ayala [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2001. – Vol. 29, № 4. – P. 552-558.
131. Hokayem M. Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients / M. Hokayem, E. Blond, H. Vidal // *Diabetes. Care.* – 2013. – Vol. 36, № 6. – P. 1454-1461.
132. Chopra R.N. Medicinal plants in diabetes / R.N. Chopra // *Indig. Dr. Ind.* – 1958. – Vol. 2. – P. 314-316.
133. Ковельман И.Р. Современные подходы к фармакотерапии сахарного диабета II типа / И.Р. Ковельман, А.И. Точилкин, Н.Ф. Беяева и др. / *Вопросы медицинской химии.* – 2002. – Т. 48, № 3. – С. 337-352.
134. Конечна Р.Т. Фітозасоби в лікуванні цукрового діабету / Р.Т. Конечна, В.П. Новіков // *Вісник Національного університету «Львівська політехніка».* – 2008. – № 622. – С. 64-70.
135. Томашевський Я.І., Павловський М.П., Пічкарь Й.І. Цукровий діабет (Діагностика, профілактика, харчування, фітотерапія) / Томашевський Я.І., Павловський М.П., Пічкарь Й.І. // – Львів;Ужгород, 1996. - 128 с.
136. Чекина Н.А. Сахарный диабет: возможности фармакотерапии с использованием средств растительного происхождения / Н.А.Чекина, С.А.Чукаев, С.М.Николаев // *Вестник Бурятского госуниверситета.* – 2010. – Т 12. – С. 71-78.

137. Ковельман И.Р. Современные подходы к фармакотерапии сахарного диабета II типа / И.Р. Ковельман, А.И. Точилкин, Н.Ф. Беляева // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т.48, № 3. – С. 337–352.
138. Chihiro Y.N. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications / Y.N. Chihiro // Pharmacological Reviews. – 1998. – Vol. 50, № 1. – P. 21–33.
139. Koukoulitsa C. Evaluation of aldose reductase inhibition and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *Origanum vulgare L. ssp. hirtum*. / C. Koukoulitsa, C. Zika, G.D. Geromichalos [et al.] // Bioorg. Med. Chem. // 2006. – Vol. 14. – P. 1653–1659.
140. Saber A.S. Protective effect of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) leaves extract on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in Albino rats / A.S. Saber, A.L. Hawazen // Life. Sci. J. – 2012. – Vol. 9. – P. 779–785.
141. Majid T. Rosmarinic acid ameliorates diabetic nephropathy in uninephrectomized diabetic rats / T. Majid, A. Hasan, K. Alireza // Iran. J. Basic. Med. Sci. – 2011. – Vol. 14. – P. 275–283.
142. Tomas-Barberan F.A. Inhibition of lens aldose reductase by Labiatae flavonoids / F.A. Tomas-Barberan, C. Lopez-Gomez, A. Villar [et al.] // Planta. Med. – 1986. – Vol. 3. – P. 239–240.
143. Varma S.D. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase / S.D. Varma, I. Mikuni, J.H. Kinoshita // Science – 1975. – Vol. 188. – P. 1215–1216.
144. Li R. In vivo antioxidative effect of isoquercitrin on cadmium-induced oxidative damage to mouse liver and kidney / R. Li, C. Yuan, C. Dong // Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. – 2011. – Vol. 383. – P. 437–445.
145. Jin H.Y. Neuroprotective effects of *Vitis vinifera* extract on prediabetic mice induced by a high-fat diet / H.Y. Jin, Y.S. Cha, H. S. Baek [et al.] // J. Intern. Med. – 2013. – Vol. 28, № 5. – P. 579–586.

146. Park S.H. Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice / S.H. Park, T.S. Park, Y.S. Cha // Nutr. Res. Pract. – 2008. – Vol. 2, № 4. – P. 227-233.
147. Margina D. Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from *Vitis vinifera*, *Aesculus hippocastanum* and *Curcuma longa* / D. Margina, O. T. Olaru, M. Ilie [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. 1681–1688.
148. Gundogdu M. Organic acids, sugars, vitamin C content and some pomological characteristics of eleven hawthorn species (*Crataegus spp.*) from Turkey M.Gundogdu, K. Ozrenk, S. Ercisli /Attila. Hegedus. Biol. Res. – 2014. – Vol. 47, № 1. – P. 21 – 29.
149. Tabatabaei-Malazy O. Targeting metabolic disorders by natural products / O. Tabatabaei-Malazy, B. Larijani, M. Abdollahi // J. Diabetes. Metab. Disord. – 2015. – Vol. 14, № 57. – doi: 10.1186/s40200-015-0184-8.
150. Kaczmar T. Herbal support for diabetes management / T. Kaczmar // Clin. Nutr. Insights. – 1998. – Vol. 6, № 8. – P. 1-4.
151. Broca C. 4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties / C. Broca, R. Gross, P. Petit [et al.] // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 277, № 4. – P. 617-623.
152. Haeri M.R. The effect of fenugreek 4-hydroxyisoleucine on liver function biomarkers and glucose in diabetic and fructose-fed rats / M.R. Haeri, M. Izaddoost, M.R. Ardekani [et al.] // Phytother. Res. – 2009. – Vol. 23, № 1. – P. 61-64.
153. Grover J.K. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential / J.K. Grover, S. Yadav, V. Vats // J. Ethnopharmacol. – 2002. – Vol. 81, № 1. – P. 81-100.
154. Alauddin M. Antihyperglycemic Effect of *Trigonella Foenum-Graecum* (Fenugreek) Seed Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats and Its Use in Diabetes Mellitus: A Brief Qualitative Phytochemical and Acute Toxicity Test

on the Extract Asmena Mowla / M. Alauddin, Md. Atiar Rahman, K. Ahmed // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 255–261.

155. Chauhan A. Plants having potential antidiabetic activity: a review / A. Chauhan, P.K. Sharma, P. Srivastava, N. Kumar, R. Duehe // Der. Pharm. Lett. – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 369–387.

156. Xu Z. The antidiabetic activity of total lignan from Fructus Arctii against alloxan induced diabetes in mice and rats / Z. Xu, X. Wang, M. Zhou [et al.] // Phytother. Res. – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 97–101.

157. Cohen A. Progress in the treatment of type 2 diabetes: new pharmacologic approaches to improve glycemic control / A. Cohen, E.S. Horton // Curr. Med. Res. Opin. – 2007. – Vol. 23. – P. 905–917.

158. Zhao F. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway / F. Zhao, L. Wang, K. Liu // Ethnopharmacol. – 2009. – Vol. 122, № 3. – P. 457–462.

159. Cool B. Identification and characterization of small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome / B. Cool, B. Zinker, W. Chiou [et al.] // Cell Metab. – 2006. – Vol. 3. – P. 403–416.

160. Huang S.L. Arctigenin, a natural compound, activates AMP-activated protein kinase via inhibition of mitochondria complex I and ameliorates metabolic disorders in ob/ob mice / S.L. Huang, R.T. Yu, J. Gong [et al.] // Diabetologia. – 2012. – Vol. 55, № 5. – doi:10.1007/s00125-011-2366-3.

161. Yao X. Arctigenin enhances chemosensitivity of cancer cells to cisplatin through inhibition of the STAT3 signaling pathway / X. Yao, F. Zhu, Z. Zhao, C. Liu, L. Luo, Z. Yin // J. Cell. Biochem. – 2011. – Vol. 112. – P. 2837–2849.

162. Lee J.Y. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits type I–IV allergic inflammation and pro-inflammatory enzymes / J.Y. Lee, C.J. Kim // Arch Pharm Res. – 2010. – Vol. 33. – P. 947–957.

163. Tang X. Arctigenin efficiently enhanced sedentary mice treadmill endurance / X. Tang, J. Zhuang, Chen J. [et al.] // *PLoS. One.* – 2011. – Vol. 6. – P. 1-13.
164. Smith U. Does diabetes therapy influence the risk of cancer / U. Smith, E.A. Gale // *Diabetologia.* – 2009. – Vol. 52. – P.1699-1708.
165. Parnell J.A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults / J.A. Parnell, R.A. Reimer // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 89. – P. 1751–1759.
166. Kelly G. Inulin-type prebiotics – a review. Part 1 / G. Kelly, A.K. Gupta // *J. Altern. Rev. Med.* – 2008. – Vol. 13. – P. 315-329.
167. Block E. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic, structural, mechanistic and synthetic studies / E. Block, S. Ahmad, J.L. Catalfamo [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1986. – Vol. 108. – P. 7045-7055.
168. Liu C.T. Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats / C.T. Liu, H. Hse, C.K. Lii [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 516. – P. 165-173.
169. Mathew P.T. Studies on the effect of allicin (diallyl disulphide-oxide) on alloxan diabetes I. Hypoglycaemic action and enhancement of serum insulin effect and glycogen synthesis / P.T. Mathew, K.T. Augusti // *Indian. J. Biochem. Biophys.* – 1973. – Vol. 10, № 3. – P. 209-12.
170. Abbas M. Effect of garlic on lipid profile and expression of LXR alpha in intestine and liver of hypercholesterolemic mice / M. Abbas, E. Abbasi // *J. Diabetes. Metab. Disord.* – 2014. – Vol. 13, № 1. – doi: 10.1186/2251-6581-13-20.
171. Baranowski M. Biological role of liver X receptors / M. Baranowski // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 31-55.
172. Chauhan A. Plants having potential antidiabetic activity: a review / A. Chauhan, P.K. Sharma, P. Srivastava [et al.] // *Der. Pharm. Lett.* – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 369-387.

173. Andres-Lacueva C. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory / C. Andres-Lacueva, B. Shukitt-Hale, R. Galli [et al.] // *Nutr. Neurosci.* – 2005. – Vol. 8. – P. 111-120.

174. Wu X.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by hplc-esims/ms in common foods in the united states: Fruits and berries / X.L. Wu, R.L. Prior // *J. Agr. Food. Chem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 2589-2599.

175. Lau F.C. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging / F.C. Lau, B. Shukitt-Hale, J.A. Joseph // *Neurobiol. Aging.* – 2005. – Vol. 26. – P. 128-132.

176. Basu A. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome / A. Basu, M. Du, M.J. Leyva [et al.] // *J. Nutr.* – 2010. – Vol. 140. – P. 1582-1587.

177. Grace M.H. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *vaccinium angustifolium* maiton / M.H. Grace, D.M. Ribnicky, P. Kuhn [et al.] // *Phytomedicine.* – 2009. – Vol. 16. – P. 406–415.

178. Stull A.J. Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women / A.J. Stull, K.C. Cash, W.D. Johnson [et al.] // *J. Nutr.* – 2010. – Vol. 140. – P. 1764–1768.

179. Martineau L.C. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. / L.C. Martineau, A. Couture, D. Spoor [et al.] // *Phytomedicine* – 2006. – Vol. 13. – P. 612–623.

180. Prior R.L. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity / R.L. Prior, X. Wu, L. Gu [et al.] // *J. Agric. Food. Chem.* – 2008. – Vol. 56. – P. 647–653.

181. Mitchell S. E. Blueberry Intake Alters Skeletal Muscle and Adipose Tissue Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activity and Reduces Insulin Resistance in Obese Rats / S.E. Mitchell, I.I. Tanone, D.E. Urcuyo-Llanes // *J. Med. Food.* – 2011. – Vol. 14, № 12. – P. 1511–1518.

182. Nehlin J.O. Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes / J.O. Nehlin, J.P. Mogensen, I. Petterson [et al.] // Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1067. – P. 448–453.
183. Burrowes J.D. Herbs and dietary supplement use in patients with stage 5 chronic kidney disease / J.D. Burrowes, G. Van Houten // Nephrol. Nurs. J. – 2006. – Vol.33. – P. 85-88.
184. Garjani A. Study of hypoglycemic activity of the hydroalcoholic extract of *Urtica dioica* in normal and diabetic rats / A. Garjani, F. Fathi Azad, N. Maleki [et al.] // J. Fac. Pharm. Tabriz. Univ. Med. Sci. – 2006. – Vol. 11, № 2. – P. 65-69.
185. Kavalali G. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats / G. Kavalali, H. Tuncel, S. Goksel [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2003. – Vol. 84. – P. 241-245.
186. Mahsa R. Evaluation of alpha- amylase inhibition by *Urtica dioica* and *Juglans regia* extracts Iran / R. Mahsa, J. Samaneh, M. Soheila [et al.] // J. Basic. Med. Sci. – 2014. – Vol. 17. – P. 466-470.
187. Farzami B. Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfuse islet of Langerhans and its vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats / B. Farzami, D. Ahmadvand, S. Vardasbi [et al.] // J. Ethnopharm. – 2003. – Vol. 89. – P. 47-53.
188. Cao H. Cinnamon extract regulates glucose transporter and insulin-signaling gene expression in mouse adipocytes / H. Cao, D.J. Graves, R.A. Anderson // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 17, № 13. – P. 1027-1032.
189. Medagama A.B. The glycaemic outcomes of Cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials / Medagama A.B. // Nutr. J. – 2015. – Vol. 14. – doi: 10.1186/s12937-015-0098-9.
190. Broadhurst C.L. Nutrition and non-insulin dependent diabetes from an anthropological perspective / C.L. Broadhurst // Alt. Med. Rev. – 1997. – Vol. 2 – P. 378-399.

191. Anderson R.A. Isolation and characterization of chalcone polymers from Cinnamon with insulin like biological activity / R.A. Anderson, C.L. Broadhurst, M.M. Polansky [et al.] // J. Agric. Food. Chem. – 2004. – Vol. 52, № 1. – P. 65-70.
192. Khan A. Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices / A. Khan, N.A. Bryden, M.M. Polansky [et al.] // Bio. Trace. Element Res. – 1990. – Vol. 24. – P. 183-188.
193. Zaidi S.F. Diverse pharmacological properties of *Cinnamomum cassia* / S.F. Zaidi, M. Aziz, J.S. Muhammad [et al.] // Pak. J. Pharm. Sci. – 2015. – Vol. 28, № 4. – P. 1433-1438.
194. Shatwan I.A. Effect of barley flour, crude cinnamon, and their combination on glycemia, dyslipidemia, and adipose tissue hormones in type 2 diabetic rats / I.A. Shatwan, L.A. Ahmed, M.M. Badkook // J. Med. Food. – 2013. – Vol. 16, № 7. – P.656-662.
195. Issac A. Effects of the polyphenol content on the anti-diabetic activity of *Cinnamomum zeylanicum* extracts / A. Issac, E. Ninan, B. Maliakel, R. Kuttan // Food. Funct. – 2014. – Vol. 5, № 9. – P. 2208-2220.
196. Letteron P. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice / P.Letteron // Biochem. Pharmacol. – 1990. – Vol. 39. – P. 2027-2034.
197. Radha K. Herbal medicines for liver diseases / K. Radha, Y.K. Chawla // Dig. Dis. Sci. – 2005. – Vol. 50, № 10. – P. 1807-1812.
198. Corchete P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin / P. Corchete, K.G. Ramawat, J.M. Merillon [et al.] // Bioactive molecules and medicinal plants – 2008. – Vol. 20. – P. 123-148.
199. Щекатихина А.С. Пероксидазное окисление силимарина и силибинина / А.С. Щекатихина, Т.А. Кукулянская // Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2007. – Том II. – С.157-171.

200. Sonnenbichler J. Stimulatory effects of silibinin and silichristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells / J. Sonnenbichler, F. Scalera, I. Sonnenbichler [et al.] // J. Pharm. Exp. Ther. – 1999. – Vol. 290. – P. 1375-1383.
201. Huseini F.H. The Efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Silymarin) in the Treatment of Type II Diabetes: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Clinical Trial / F.H. Huseini, Larijani B. // Phytother. Res. – 2006. – Vol. 20, № 12. – P. 1036-1039.
202. Kazazis C.E. The therapeutic potential of milk thistle in diabetes / C.E. Kazazis, A.A. Evangelopoulos, A. Kollas [et al.] // Rev. Diabet. Stud. – 2014. – Vol. 11, № 2. – P. 167-174.
203. Saber A.A. Evaluating the Effect of *Silybum marianum* Extract on Blood Glucose, Liver and Kidney Functions in Diabetic Rats / A.A. Saber // Adv. St. Biol. – 2013. – Vol. 5. – P. 447 – 454.
204. Giampieri F. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health / F. Giampieri // Nutrition. – 2012. – Vol. 28 – P. 9-19.
205. Ruckmani M.E. Evaluation of Hypolipidemic Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts of *Fragaria vesca* in High Fat Diet Induced Hyperlipidemia in Rats / M.E. Ruckmani, A.V. Ramana, Y.V. Konda // Int. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2014. – Vol. 28, № 34. – P. 191-196.
206. Okuda T. Ellagitannins as active constituents of medical plants / T. Okuda, T. Yoshida, T. Hatano // Planta. Med. – 1989. – Vol. 55. – P. 117–122.
207. Lalit K. Effect Of fruit Extract of *Fragaria Vesca L.* on experimentally induced inflammatory bowel disease in albino rats, Diuretic and Nephroprotective activity of fruits of *fragaria vesca linn* / K. Lalit, B. Mondita, S. Das // Indian. J. Pharmacol. – 2011. – Vol. 43, № 1. – P. 18-21.
208. Park J.S. Hypoglycemic effect of *Yacon tuber* extract and Its constituent, chlorogenic acid, in streptozotocin-induced diabetic rats / J.S. Park, J.S. Yang, B.Y. Hwang [et al.] // Biomolecules & Therapeutics. – 2009. – Vol. 17, №3. – P. 256–262.

209. Gouveia N.M. An in vitro and in vivo study of the α -amylase activity of Phaseolamin / N.M. Gouveia, F.V. Alves, F.B. Furtado [et al.] // Med. Food. – 2014. – Vol. 17, № 8. – P.915-920.
210. Ngho Y.Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) / Y.Y. Ngho, C.Y. Gan // Food Chem. – 2016. – Vol. 190. – P. 331-337.
211. Campbell P.M. Comparison of the α -amylase inhibitor-1 from common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties and transgenic expression in other legumes-post-translational modifications and immunogenicity / P.M. Campbell, D. Reiner, A.E. Moore [et al.] // Agric. Food. Chem. – 2011. – Vol. 59, № 11. – P. 6047-6054.
212. Petlevski R. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. / R. Petlevski, M. Hadzija, M. Slijepcevic, D. Juretic // Ethnopharmacol. – 2001. – Vol. 75, № 2-3. – P. 181-184.
213. Kotaru M., Iwami K., Yeh H.Y., Ibuki F. In vivo action of alpha-amylase inhibitor from cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*) in rat small intestine / M. Kotaru, K. Iwami, H.Y. Yeh, F. Ibuki // J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). – 1989. – Vol. 35, № 6. – P.579-88.
214. Ramirez-Jimenez A.K. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours / A.K. Ramirez-Jimenez, R.R. Camacho, S. Mendoza-Diaz // Food. Res. Intern. – 2015. – Vol. 76, № 1. – P. 92–104.
215. Aurea K. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms / K. Aurea, R. Ramírez-Jiménez, M. Reynoso-Camacho [et al.] // Food. Res. Intern. – 2015. – Vol. 76, № 1. – P. 92-104
216. Khaleeva L.D. Comparative evaluation of the hypoglycemic activity of the vegetal complex of *Phaseolus vulgaris* and chlorpropamide in experimental diabetes / L.D. Khaleeva, L.N. Maloshtan, A.G. Sytnik // Probl. Endokrinol. (Mosk). – 1987. – Vol. 33, № 2. – P. 69-71

217. Neef H. Hypoglycemic activity of selected European plants / H. Neef, P. Declercq, G. Laekeman // *Phytother. Res.* – 1995. – Vol. 9. – P.45-48.
218. Pari L. Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes / L. Pari, S.J. Venkateswaran // *Med. Food.* – 2004. – Vol. 7, № 2. – P. 204-209.
219. Venkateswaran S. Effect of *Phaseolus vulgaris* on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes / S. Venkateswaran, L. Pari, G. J. Saravanan // *Med Food.* – 2002. – Vol. 5, № 2. – P. 97-103.
220. Ивашин Д. С. Справочник по заготовкам лекарственных растений / Д. С. Ивашин, З. Ф. Катина, И. З. Рыбачук. – Київ: Урожай, 1986. – 280 с.
221. Masjedia F. Preventive Effect of Garlic (*Allium sativum* L.) on Serum Biochemical Factors and Histopathology of Pancreas and Liver in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats / F. Masjedia, A. Golb, S. Dabiric // *Iran. J. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 12. – № 3. – P. 325-338.
222. Braz J. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocin-induced diabetes / J. Braz, L. Pari, S. Venkateswaran // *Med. Biol. Res.* – 2003. – Vol. 36, № 7. – P. 861-870.
223. Горбулінська О.В. Цукрознижувальна дія водних екстрактів якона (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) / О.В. Горбулінська, М.Р. Хохла, Л. Т. Міщенко та ін. // *Біологічні Студії* – 2014. – Vol. 8, №2. – С. 57–64.
224. Волошина О. С. Доклінічні дослідження лікарських засобів: конспект лекцій для студ. Напрямку підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / О. С. Волошина. – Київ: НУХТ, 2013. – 102 с.
225. Zafar M. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study / M. Zafar, S. Naqvi // *Int. J. Morphol.* – 2010. – Vol. 28, №1. – P. 135-142.

226. Crowther J. R. The ELISA Guidebook / J.R. Crowther. – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001. – P. 436.
227. Гликозилированный гемоглобин / Диагностический набор // Pliva-lachema diagnostica. – 2008. – 10003258.
228. Sabu M.C. Effect of *Cassia auriculata* Linn. on serum glucose level, glucose utilization by isolated rat hemidiaphragm / M.C. Sabu, T. Subburaju // J.of Ethnopharmacol. – 2002. – Vol. 80. – P. 203-206.
229. Рыбальченко В. К. Структура и функции мембран: Практикум / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов. – Киев: Выща школа, 1988. – 312 с.
230. Бездробный Ю.В. Выделение плазматических мембран жировых клеток без применения коллагеназы / Ю.В. Бездробный, Н.Ю. Евдокимова // Вопр. мед. химии. – 1979. – № 3. – P. 354 – 358.
231. Северин С.Е. Практикум по биохимии: учеб. пособие / С.Е. Северин, Г.А. Соловьева. – Москва: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с. – (2-е издание).
232. Danforth W.H. Glycogen synthetase activity in skeletal muscle / W.H. Danforth // J. Biol. Chem. – 1965. – Vol. 240, № 2. – P. 588 - 593.
233. Breckenridge B.M. Glycogen synthesis from uridine diphosphate glucose in brain / B.M. Breckenridge, E.J. Crawford // J. Biol. Chem. – 1960. – Vol. 235, N. 11. – P. 3054 – 3057.
234. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – Москва: Медицина, 1977. – 392 с.
235. Костюк В.А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В.А. Костюк, А. И. Потапович, Е.Ф. Лунец // Вопр. мед. химии. – 1984. – №4. – С. 125–127.
236. Сирото Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирото // Вопросы мед. клин. – 1999. – Т. 5, № 3. – С. 263-272

237. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 44 - 67.
238. Власова С.Н. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Перслегина // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19 - 22.
239. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / M.M. Bradford // *Analyt. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
240. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений / З. Брандт. – Москва: Мир, 1975. – 312 с.
241. Рубан Е. А. Перспективы создания противодиабетических препаратов на основе полифенолов: механизмы гипогликемического действия и фармакокинетика / Е. А. Рубан, Т. Е. Колиснык, Г. Д. Слипченко // *Annals of Mechnikov Institute.* – 2015. – № 4. – С. 17-24.