

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Матар Мазен Фаез

УДК 615.252.349.7.07÷615.322:[582.736.3-582.668.31]

ДИСЕРТАЦІЯ

**Дослідження антидіабетичної дії екстрактів мучниці звичайної
(*arctostaphylos uva-ursi*) з додаванням амінокислот**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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



Матар Мазен Фаез

Науковий керівник Кравченко Ганна Борисівна, кандидат біологічних наук,
доцент

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Матар Мазен Фаез Дослідження антидіабетичної дії екстрактів мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi*) з додаванням амінокислот – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 «Охорона здоров'я»). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному дослідженню гіпоглікемічної, антиоксидантної, гепатопротекторної та ліпотропної активності вперше одержаних екстрактів з листя мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi*), без додавання та з додаванням амінокислот, для корекції стану інсулінорезистентності та, відповідно, як перспективних компонентів комплексної терапії цукрового діабету 2 типу (ЦД2).

Взагалі в роботі була досліджена гіпоглікемічна активність 13 нових оригінальних сухих екстрактів мучниці звичайної листя без та з додаванням амінокислот, які були отримані на кафедрі фармакогнозії Національного фармацевтичного університету під керівництвом проф. Кошового О.М.

У першому розділі дисертації охарактеризована проблема лікування ЦД2 та корекції його ускладнень. Узагальнені дані літератури щодо сучасного погляду на біохімічні та патофізіологічні механізми патогенезу ЦД2. Надані механізми дії сучасних лікарських засобів, які застосовуються для фармакотерапії ЦД2 типу та його ускладнень. Проведено аналіз ролі фітотерапії в профілактиці та комплексному лікуванні ЦД2 та актуалізовані перспективи створення нових андіабетичних засобів рослинного походження. Обґрунтована значущість проблеми пошуку оптимальних засобів лікування та профілактики ЦД2 та його ускладнень.

У другому розділі охарактеризовані об'єкти досліджень та детально описаний дизайн експерименту із пошуку найбільш ефективних з

досліджуваних субстанцій. Обґрунтовано застосування експериментальних моделей інсулінорезистентності (ІР) для поглибленого вивчення відібраних екстрактів. Наведено методи досліджень щодо вивчення гіпоглікемічної активності, методи визначення біохімічних показників, які характеризують гепатопротекторну, ліпотропну та антиоксидантну дію. Представлено комплекс морфофункціональних досліджень підшлункової залози, які були виконані з метою оцінки панкреопротекторної дії екстрактів на тлі експериментальної ІР.

У *третьому розділі* наведені результати та обговорення первинних скринінгових досліджень гіпоглікемічної активності, які були проведені на тваринах з нормальним вуглеводним гомеостазом. На першому етапі цих досліджень вивчали три нові поліфенольні сухі екстракти мучниці звичайної листя – 50% спиртовий (ПЕ₅₀), 90% (ПЕ₉₀) та водний (ПЕ_В). Для оцінки їхньої гіпоглікемічної дії був використаний оральний тест на толерантність до глюкози (ОТТГ). Результатом цих досліджень було визначення екстракту з найбільш високою гіпоглікемічною активністю, а саме ПЕ₅₀ з листя мучниці звичайної, який і був використаний для подальшого вивчення. Також була визначена його найбільш ефективна доза – 100 мг/кг. При дослідженні гострої токсичності нових отриманих поліфенольних екстрактів, зокрема дослідження гострої токсичності ПЕ₅₀, було доведено, що як при внутрішньошлунковому введенні, так і внутрішньоочеревинному введенні, ПЕ₅₀ відноситься до V класу «практично нетоксичні речовини».

Після модифікації ПЕ₅₀ додаванням амінокислот (цистеїн, фенілаланін, валін, гліцин, аланін, лейцин, гістидин, лізин, аргінін, глутамінова кислота) з отриманням 10 нових екстрактів, був здійснений наступний етап експериментального дослідження, який включав скринінгові дослідження гіпоглікемічної активності з метою відбору найбільш активних модифікованих поліфенольних екстрактів для подальшого вивчення. Для цього також використовували метод з навантаженням глюкозою (ОТТГ) у нормоглікемічних щурів. Для більшої наочності також розраховували площу

під гіпоглікемічною кривою (Area under Curve, AUC). Найактивнішими модифікованими екстрактами виявилися поліфенольні екстракти з додаванням аргініну (ПЕарг) та цистеїну (ПЕцис). Введення ПЕ₅₀ знижувало концентрацію глюкози в крові через 60 хвилин на 14,3 % порівняно з групою контрольної патології. У той же час додавання амінокислот підсилює цей ефект. Так, у групі тварин ПЕарг рівень глюкози знизився через годину на 16 %, у групі тварин ПЕцис – на 15,2 %, що дещо поступається ефективності референтному препарату метформіну, але практично не відрізняється від дії збору «Арфазетин». Таким чином, вперше експериментально доведено, що додавання амінокислот аргініну та цистеїну до поліфенольного екстракту ПЕ₅₀ потенціює його гіпоглікемічну активність. Це дало підстави для того, щоб відібрати ПЕарг та ПЕцис для подальшого дослідження їхньої гіпоглікемічної дії.

У четвертому розділі обговорені результати подальшого поглибленого дослідження відібраних екстрактів та вивчення можливих механізмів їхньої антидіабетичної дії. Дослідження фармакологічної активності субстанцій проводили на моделях ІР, які потенційно призводять до розвитку ЦД2. Були вибрані дві моделі, ефективність яких була доведена в багатьох експериментах на щурах: ІР викликана тривалими внутрішньоочеревинними ін'єкціями низьких доз дексаметазону (15 мкг/кг маси тіла) та дієта з високим вмістом фруктози (високофруктозна дієта, ВФД). Для вивчення можливих механізмів антидіабетичної дії визначалися показники, які характеризують ліпідний обмін та стан печінки, як одного з основних органів, який приймає участь у розвитку ІР. В усіх експериментальних групах тварин, в яких моделювали патологію, розвиток ІР доводився за допомогою розрахунку індексу НОМА-ІР.

При проведенні ОТТГ, було встановлено, що в групі тварин з дексаметазон-індукованою ІР значення AUC, було принаймні в 3 рази більше, ніж відповідна площа в групі інтактних тварин. Достовірні зміни в концентрації глюкози в крові були зафіксовані при пероральному прийомі

ПЕарг та ПЕцис протягом 14 діб, так спостерігалось зниження рівня глюкози на 36,5% та 35,1%, відповідно, при порівнянні з групою контрольної патології. Ефект, що спостерігали перевищував ефект ПЕ₅₀ (26,4 %) і наближався до результату, який спостерігався в групі тварин, які отримували референс-препарат метформін (38,2%).

У групі тварин, які отримували ВФД, базальний рівень глюкози достовірно, у 1,69 раза, перевищував показники інтактного контролю. Це вплинуло на площі АUC, яка була вдвічі більшою, ніж у інтактних тварин. ОТТГ показав, що у тварин після двотижневого введення ПЕарг та ПЕцис, рівень глюкози в крові на 30-й та 60-й хвилинах був достовірно нижче при порівнянні з контрольною патологією, а до 120-ї хвилини досягло вихідного рівня. Ефект ПЕарг і ПЕцис, що спостерігався на 120-й хвилині після навантаження глюкозою, був вірогідно вищим за аналогічний показник екстракту ПЕ₅₀ без амінокислот.

Показано, що ПЕарг і ПЕцис після двотижневого введення виявили здатність знижувати рівень глюкози в крові у щурів з ІР, а також гальмувати розвиток ІР і покращувати толерантність до глюкози при експериментальній ІР. Отримані дані свідчать про важливу роль модифікації ПЕ₅₀ аргініном та цистеїном для корекції наслідків ІР, імовірно на процеси передачі сигналу в клітинах-мішенях інсуліну.

Слід також зазначити, що при вивченні потенціальних механізмів дії ПЕарг та ПЕцис, а саме гіполіпідемічної дії та гепатопротекторної дії, зазначені субстанції демонстрували суттєвий вплив на показники, що досліджувалися і на тлі дексаметазон-індукованої ІР та ІР, яка викликана ВФД. Узагальнюючи результати можна підкреслити, що обидва поліфенольних екстракти з додаванням амінокислот достовірно знижували загальні ліпіди (ЗЛ) та вільні жирні кислоти (ВЖК) сироватки крові. Також, обидва екстракти пригнічували оксидативний стрес, що є свідомством антиоксидантної активності. Показники, а саме, активність ферментів (аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та гамма-

глутамілтранспептидази (ГГТП), які характеризують стан печінки, стабілізувалися після двотижневого введення ПЕарг та ПЕцис на тлі ІР.

Результати експериментів довели певні відмінності в активності досліджуваних екстрактів, так ПЕцис має більш виразну антиоксидантну та ліпотропну активність, однак, ПЕарг виявив більшу здатність до зниження рівня глюкози в крові на тлі ІР. В обговоренні результатів експериментів наведені вірогідні причини таких відмінностей. Таким чином, отримані експериментальні результати виявили значущість листя мучниці звичайної як сировини для створення препарату з протидіабетичною дією.

У п'ятому розділі продемонстровані та обговорені здійснені гістоморфологічні дослідження підшлункової залози після 14-денного введення ПЕарг та ПЕцис на тлі експериментальної ІР. Крім оцінки патоморфологічних змін острівців Ларгенганса, в гомогенатах підшлункової залози визначали показники, які можуть вказувати на наявність оксидативного стресу (вміст активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), дієнових кон'югатів (ДК), відновленого глутатіону (ГлВ) та активність ферментів системи антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ) та глутатіонпероксидази (ГП).

На основі отриманих даних встановлено, що стан дексаметазон-індукованої ІР призводить до виникнення морфологічних ознак певної пригніченості інсулярного апарату. Насамперед це проявляється у підвищенні чисельності дрібних панкреатичних острівців та зменшенні частки середніх; посилений режим функціонування бета-клітин призводить до гіпертрофії та дистрофії і, в подальшому, до їхньої загибелі та різного ступеню спустошеності, що є характерним для картини ЦД2. В підшлунковій залозі щурів після введення ПЕарг та ПЕцис в ендокринній паренхімі гістологічно виявлено менш показові деструктивно-дистрофічні прояви та візуалізація збільшення морфологічно більш повноцінних інсуліноцитів. В певній мірі відновлюється кількісний вміст панкреатичних острівців та нормальний відсотковий розподіл їх за розміром (наповненістю бета-клітинами).

Отримані гістологічні результати свідчать, що ВФД також призводить до певної активації компенсаторно-адаптивних змін інсулярного апарату щурів та провокує виникнення дистрофічно-деструктивних змін в низці панкреатичних острівців, спустошення деяких острівців. Але ця картина морфологічно відрізняється від такої, яка індукована дексаметазоном. А саме, зареєстрована поява «розпластаних» великих острівців. ПЕарг та ПЕдис надають захисний ефект проти негативного впливу ІР. Морфологічно це проявляється у зменшенні деструктивно-дистрофічно змінених та збільшенні функціонально повноцінних інсуліноцитів, і, як наслідок, відновленні (в тому чи іншому ступеню) нормального розподілу панкреатичних острівців за розміром.

При порівнянні панкреопротекторної дії досліджених екстрактів певну перевагу має модифікація ПЕ₅₀ з аргініном. ПЕарг здійснює ефект, який перебільшує вплив препарату порівняння фітозбору «Арфазетин», та трохи поступається дії іншого референтного препарату – метформіну.

Заключний розділ дисертації присвячений обговоренню та узагальненню результатів досліджень. У стислому вигляді наводиться викладена в дисертації наукова інформація, представлені результати вирішення поставлених завдань. Відображена наукова новизна досліджень та перспективи подальшої розробки антигіперглікемічних лікарських препаратів на основі модифікованих сухих екстрактів з листя мучниці звичайної.

За результатами виконаних експериментальних досліджень видані: патент України на винахід № № 124042, 2021 р.; Патент України на корисну модель № 142210, 2020 р.; Патент України на винахід № 124043, 2021 р.; Патент України на корисну модель № 142930, 2020 р.

Результати дисертаційних досліджень упроваджено в навчальний процес низки закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю України.
Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, інсулінорезистентність, гіпоглікемічна дія, мучниця звичайна, екстракт листя; модифікація, гепатопротекторна дія,

антиоксидантна активність, ліпотропна активність, панкреопротекторна дія, аргінін, цистеїн, фенольні сполуки.

Список публікацій здобувача:

1. Kravchenko G. B., Matar M., Krasilnikova, O. A. Screening of Bearberry leaves extracts hypoglycemic effect and study of acute toxicity. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 2 (55). С. 13-16. <https://doi.org/10.24959/ubphj.18.173>. (Особистий внесок – брав участь в проведенні експерименту, узагальненні результатів експерименту та підготовці статті).
2. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Study of bearberry leaves extracts hypoglycemic action under experimental insulin resistance in rats. *Клінічна фармація*. 2020. № 3 (24), С. 54-57. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
3. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats. *Медична та клінічна хімія*. 2020. № 1 (22). С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
4. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Матар М., Кравченко А.Б., Ковальова А.М., Кіреєв І.В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
5. Chaika N., Matar M., Koshovyi O., Kravchenko G., Goryacha O., Kireyev I., Kovalenko S., Darmograi R. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. №3 (31). 2021. P. 42-50.

<https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>. (**Scopus**). (Особистий внесок – брав участь в проведенні експерименту та узагальненні його результатів).

6. Matar M., Kravchenko G., Krasilnikova, O. Study of hepatoprotective effect of bearberry leaves extract under insulin resistance in rats. *EUREKA: Health Sciences*. 2021. № 6. P. 48-53. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.002174>.

7. Kravchenko G., Krasilnikova O., Raal A., Matar M., Chaika N., Kireyev I., Grytsyk A., Koshovyi O. Arctostaphylos uva-ursi L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>. (**Scopus**). (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження щодо одержання екстрактів та вивчення їх хімічного складу, статистична обробка результатів, підготовлено статтю до друку).

8. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід 124043 Україна, № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27.4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

9. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на кор. мод. 142210 Україна, № u 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020; Бюл. № 10. 4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

10. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О.А., Мазен М., Чайка Н.Б. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат .на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13.4.

(Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

11. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № а2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

12. Kravchenko G.B., Matar M. Study of Bearberry Leaves Polyphenol Extracts Acute Toxicity. V Національний з'їзд фармакологів України: тези доповідей, 18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя. ВГО «Асоціація фармакологів України», 2017. С. 72-73.

13. Кравченко Г.Б., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів рослин сімейства вересових на моделі експериментальної інсулінорезистентності. Міжнародна науково-практична конференція «Медичні науки: історія розвитку, сучасний стан та перспективи досліджень»: збірник тез наукових робіт учасників, 22-23 вересня 2017 р., м. Львів. ГО «Львівська медична спільнота», 2017. С. 59-61.

14. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Матар М., Кравченко А.Б. Вивчення хімічного складу та фармакологічної активності сухого екстракту листя мучниці звичайної. I міжнар. наук.-практ. конф. «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»: матеріали, 30-31 березня 2017, м. Харків. в 2-х т. X.: НФаУ, 2017. Т. 2. С. 350-351.

15. Matar M. Comparative Study of Bearberry Polyphenol Concentrates Effects on Antioxidant Status under Experimental Insulin Resistance in rats. IV International Scientific-Practical Conference of Students and Young Scientists «Science and Medicine: a Modern View of Youth»: Collection of Abstracts of Almaty, 20-21 April, 2017 P. 257.

16. Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry. Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018. Kaunas, 2018. P. 40.

17. Kravchenko G. B., Krasilnikova O. A., Matar M. The Effect of Polyphenol Administration on Plasma Lipid Composition under Experimental Insulin Resistance. Prospects for the Development of Medicine in EU Countries and Ukraine: International scientific and practical conference, 21–22 December 2018, Wloclawek, Republic of Poland. Wloclawek: Izdevnieciba «Baltija Publishing», 2018. P. 99-101.

18. Matar M., Kravchenko G.B. Effect of Bearberry Leaves Polyphenol Extract on Some Lipid Indices under Experimental Insulin Resistance. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф., 28-29 березня 2018 р., м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 13.

19. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням амінокислот. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. 12-13 березня 2020, м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 334-336.

20. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Мазен М. Вплив поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну на стан підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності. Двадцяті Данилевські читання. Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: збірник тез наук.-практ. конф. з онлайн-трансляцією 11 лютого 2021, м. Харків. ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», 2021. С. 34-35.

21. Matar M. Hepatoprotective Effect of bearberry Leaves Extracts under Dexamethasone Induced Insulin Resistance in Rats. Topical Issues of Experimental and Clinical Biochemistry: International Scientific and Practical Conference, 01 October, 2021, Kharkiv, Ukraine. X.: HΦaY, 2021. C. 271-272.

ANNOTATION

Matar Mazen Fayez Study of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) extracts with the addition of amino acids antidiabetic effect – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a philosophic doctor pharmaceutical science degree in speciality 226 «Pharmacy, industrial pharmacy». – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis is devoted to the experimental study of hypoglycemic, antioxidant, hepatoprotective and lipotropic activity of the bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*), leaf extracts without and with the addition of amino acids, for the correction of insulin resistance and, accordingly, as promising components of the complex therapy of type 2 diabetes mellitus (T2DM).

In general, the hypoglycemic activity of 13 new original dry bearberry leaf extracts without and with the addition of amino acids were investigated, extracts were obtained at the Pharmacognosy Department of the National University of Pharmacy under the guidance of prof. Koshovyi O.M.

The first chapter of the thesis describes the problem of T2DM treatment and correction of its complications. Summarized literature data on the biochemical and pathophysiological mechanism's modern view on the T2DM pathogenesis. Mechanisms of action of modern drugs used for T2DM pharmacotherapy and its complications are provided. An analysis of the role of T2DM phytotherapy in the prevention and complex treatment was carried out, and the prospects for the creation of new antidiabetic herbal remedies design were updated. The importance of the problem of finding optimal means of T2DM treatment and prevention and its complications is substantiated.

In the second chapter, the objects of research are characterized and the experiment design in order to search for the most effective of the studied substances is described in detail. The use of insulin resistance (IR) experimental models for in-depth study of selected extracts is substantiated. Research methods for studying

hypoglycemic activity, methods for determining biochemical indices characterizing hepatoprotective, lipotropic and antioxidant effects are presented. A set of morphofunctional studies of the pancreas, which were performed to evaluate the pancreoprotective effect of extracts under the experimental IR, is presented.

The third chapter presents the results and discussion of the primary screening studies of hypoglycemic activity, which were conducted in animals with normal carbohydrate homeostasis. At the first stage of these studies, three new polyphenolic dry bearberry leaf extracts were studied – 50% alcohol (PE₅₀), 90% (PE₉₀) and water (PE_w). An oral glucose tolerance test (OGTT) was used to evaluate their hypoglycemic effect. The result of these studies was the determination of the extract with the highest hypoglycemic activity, namely PE₅₀ from the leaves of bearberry, which was used for further study. Its most effective dose was also determined – 100 mg/kg. When studying the acute toxicity of the newly obtained polyphenolic extracts, in particular, studying the acute toxicity of PE₅₀, it was proved that both when administered intragastrically and intraperitoneally, PE₅₀ belongs to class V «practically non-toxic substances».

After PE₅₀ modification by adding amino acids (cysteine, phenylalanine, valine, glycine, alanine, leucine, histidine, lysine, arginine, glutamic acid) to obtain 10 new extracts, the next stage of the experimental study was carried out, which included screening studies of hypoglycemic activity in order to select the most active modified polyphenolic extracts for further study. For this, the method with glucose loading (OTTG) was also used in normoglycemic rats. For greater clarity, the area under the hypoglycemic curve (Area under Curve, AUC) was also calculated. Polyphenolic extracts with the addition of arginine (PE_{arg}) and cysteine (PE_{cys}) turned out to be the most active modified extracts. The administration of PE₅₀ reduced the concentration of glucose in the blood after 60 minutes by 14.3% compared to the control pathology group. At the same time, the addition of amino acids enhances this effect. Thus, in the group of PE_{arg} animals, the glucose level decreased by 16% after an hour, in the group of PE_{cys} animals - by 15.2%, which is somewhat less than the effectiveness of the reference medication metformin, but

practically does not differ from the action of the decoction «Arphasetin». Thus, it was experimentally proven for the first time that the addition of amino acids arginine and cysteine to the polyphenolic extract PE₅₀ potentiates its hypoglycemic activity. This gave grounds for selecting PEarg and PECis for further investigation of their hypoglycemic action.

The fourth chapter discusses the results of further in-depth research of the selected extracts and the study of possible mechanisms of their antidiabetic action. The study of the pharmacological activity of substances was carried out on models of IR, which potentially lead to the development of T2DM. Two models were chosen, the effectiveness of which has been proven in many experiments in rats: IR induced by long-term intraperitoneal injections of low doses of dexamethasone (15 µg/kg body weight) and a high-fructose diet (high-fructose diet, HFD). To study the possible mechanisms of antidiabetic action, indices, which characterize lipid metabolism and the state of the liver as one of the main organ that takes part in the IR development, were determined. In all experimental groups of animals in which pathology was modeled, the development of IR was proven by calculating the HOMA-IR index.

When conducting OTTG, it was found that in the group of animals with dexamethasone-induced IR, the value of AUC was at least 3 times greater than the corresponding area in the group of intact animals. Significant changes in the concentration of glucose in the blood were recorded with oral administration of PEarg and PECys for 14 days, thus a decrease in glucose level by 36.5% and 35.1% was observed, respectively, when compared with the group of control pathology. The observed effect exceeded the PE₅₀ effect (26.4%) and approached the result observed in the group of animals receiving the reference drug metformin (38.2%).

In the group of animals that were fed HFD, the basal level of glucose significantly exceeded the values of the intact control by 1.69 times. This resulted in the AUC that was twice higher than of intact animals. OTTG showed that in animals after PEarg and PECis two-week administration the level of glucose in the blood at 30 and 60 minutes was significantly lower when compared with the control

pathology, and by the 120th minute it reached the initial level. The effect of PEarg and PECys observed at the 120th minute after glucose loading was probably higher than the similar indicator of PE50 extract without amino acids.

It was shown that PEarg and PECys, after two-week administration, showed the ability to reduce the blood glucose level in rats with IR, as well as inhibit the development of IR and improve glucose tolerance in experimental IR. The obtained data indicate the important role of modification of PE₅₀ with arginine and cysteine for correcting the IR effects, presumably on signal transmission processes in insulin target cells.

It should also be noted that under studying the potential mechanisms of PEarg and PECys action, namely hypolipidemic action and hepatoprotective action, these substances demonstrated a significant effect on the parameters studied under dexamethasone-induced IR and IR caused by HFD. Summarizing the results, it can be emphasized that both polyphenolic extracts with the addition of amino acids significantly reduced total lipids (TL) and free fatty acids (FFA) in blood serum. Also, both extracts inhibited oxidative stress, which is evidence of antioxidant activity. Indices, namely, the activity of enzymes (alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (APh) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP), which characterize the state of the liver, stabilized after a two-week administration of PEarg and PECis under experimental IR.

The results of the experiments proved certain differences in the activity of the studied extracts, so PECys has a more pronounced antioxidant and lipotropic activity, however, PEarg showed a greater ability to reduce the level of glucose in the blood under experimental IR. Probable reasons for such differences are given in the discussion of experimental results. Thus, the obtained experimental results revealed the significance of the bearberry leaves as a raw material for the design of medication with antidiabetic effect.

The fifth chapter demonstrates and discusses the performed histomorphological studies of the pancreas after a 14-day administration of PEarg and PECys under the experimental IR. In addition to the pathomorphological changes

study the Largenhans islets, indices were determined in the homogenates of the pancreas that may indicate the presence of oxidative stress (the content of active products of thiobarbituric acid (TBK-AP), diene conjugates (DC), reduced glutathione (GSH) and the activity of enzymes of the system antioxidant protection (superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT) and glutathione peroxidase (GPx).

Based on the obtained data, it was established that the state of dexamethasone-induced IR leads to the appearance of morphological signs of a certain depression of the insular apparatus. First of all, this is manifested in an increase in the number of small pancreatic islets and a decrease in the proportion of medium ones; the increased mode of functioning of beta cells leads to hypertrophy and dystrophy and, subsequently, to their death and varying degrees of devastation, which is characteristic of the picture of T2DM. In the pancreas of rats after the PEarg and PEcys administration in the endocrine parenchyma, less indicative destructive-dystrophic manifestations and visualization of an increase in morphologically more complete insulinocytes were histologically revealed. To a certain extent, the quantitative content of pancreatic islets and their normal percentage distribution by size (filled with beta cells) is restored.

The obtained histological results indicate that HFD also leads to a certain activation of compensatory-adaptive changes in the insular apparatus of rats and provokes the occurrence of dystrophic-destructive changes in a number of pancreatic islets, the devastation of some islets. But this picture is morphologically different from that induced by dexamethasone. Namely, the registered appearance of «spread out» large islands. PEarg and PEcys provide a protective effect against the negative effects of IR. Morphologically, this manifests itself in a decrease in destructively dystrophically altered insulinocytes and an increase in functionally complete insulinocytes, and, as a result, in the restoration (to one degree or another) of the normal size distribution of pancreatic islets.

When comparing the pancreoprotective effect of the studied extracts, modification of PE₅₀ with arginine has a certain advantage. PEarg exerts an effect

more pronounced to the effect of the reference medication decoction «Arphazetin», and is slightly inferior to the action of another reference medication – metformin.

The final chapter of the dissertation is devoted to the discussion and summarizing of research results. The scientific information giving in the thesis is presented in a concise form, the results of solving the tasks are presented. The scientific novelty of the research and the prospects for the further development of antihyperglycemic drugs based on modified dry extracts from the bearberry leaves were displayed.

Based on the results of the experimental studies, the following were issued: patent of Ukraine for the invention No. 124042, 2021; Patent of Ukraine for utility model No. 142210, 2020; Patent of Ukraine for the invention No. 124043, 2021; Patent of Ukraine for a utility model No. 142930, 2020

The results of experimental studies have been implemented in the educational process of a number of higher education institutions of the pharmaceutical (medical) profile of Ukraine. Key words: type 2 diabetes, insulin resistance, hypoglycemic effect, bearberry, leaf extract; modification, hepatoprotective effect, antioxidant activity, lipotropic activity, pancreoprotective effect, arginine, cysteine, phenolic compounds.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО ФАРМАКОКОРЕКЦІЇ ПРЕПАРАТАМИ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ (Огляд літератури).....	32
1.1. Молекулярні механізми патогенезу та стратегії сучасної терапії цукрового діабету 2 типу.....	32
1.2 Механізми дії сучасних лікарських засобів, які застосовуються для фармакотерапії цукрового діабету 2 типу та його ускладнень.....	38
1.3 Роль фітотерапії в профілактиці та комплексному лікуванні цукрового діабету 2 типу та перспективи створення нових антигіперглікемічних засобів рослинного походження.....	43
Висновки до розділу 1.....	49
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	50
РОЗДІЛ 3 СКРИНІНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ СУХИХ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ.....	62
3.1 Вивчення гіпоглікемічної активності сухих екстрактів мучниці звичайної листя на нормоглікемічних щурах.....	62
3.2 Вивчення гіпоглікемічної активності сухих екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот на нормоглікемічних щурах.....	66
3.3 Дослідження гострої токсичності сухих екстрактів мучниці звичайної листя.....	73
Висновки до розділу 3.....	74
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ НА МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ У ТВАРИН З ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНІСТЮ.....	76
4.1 Вплив ПЕарг та ПЕдис на метаболічні зміни у щурів за умов дексаметазон- індукованої інсулінорезистентності.....	76

4.1.1 Вивчення гіпоглікемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов експериментальної дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності.....	77
4.1.2 Вивчення гіполіпідемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності.....	80
4.1.3 Дослідження гепатопротекторної активності ПЕарг та ПЕцис за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності.....	82
4.2 Вплив ПЕарг та ПЕцис на метаболічні зміни у щурів за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою.....	84
4.2.1 Вивчення гіпоглікемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою.....	86
4.2.2 Вивчення гіполіпідемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою.....	89
4.2.3 Дослідження гепатопротекторної активності ПЕарг та ПЕцис за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою.....	90
Висновки до розділу 4.....	93
РОЗДІЛ 5 МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ЇХНЯ КОРЕКЦІЇ ЕКСТРАКТАМИ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ.....	97
5.1 Гістологічне дослідження підшлункової залози щурів групи інтактного контролю.....	98
5.2. Морфофункціональні дослідження ПЗ за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності та після корекції ПЕарг та ПЕцис.....	99
5.2.1 Вивчення динаміки змін маси тіла щурів та відносна маса ПЗ за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності.....	99
5.2.2 Дослідження оксидантно-антиоксидантного гомеостазу ПЗ.....	101
5.2.3 Результати гістоморфометричних досліджень ПЗ за умов дексаметазон-індукованої дієти та при введенні ПЕарг та ПЕцис.....	104
5.3. Морфофункціональні дослідження ПЗ за умов ІР, яка викликана високофруктозною дієтою та після корекції ІР поліфенольними екстрактами	

.....	111
5.3.1 Вивчення динаміки змін маси тіла щурів та відносна маса ПЗ за умов інсулінорезистентності, яка викликана високофруктозною дієтою.....	112
5.3.2 Дослідження оксидантно-антиоксидантного гомеостазу підшлункової залози.....	114
5.3.3 Результати гістоморфометричних досліджень ПЗ за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою та при введенні ПЕарг та ПЕдис.....	115
Висновки до розділу 5.....	121
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	123
ВИСНОВКИ.....	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	138
ДОДАТКИ.....	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АЛаТ – аланінамінотрансфераза;
АсАТ – аспартатамінотрансфераза;
АТФ – аденозинтрифосфат;
ВФД – дієта збагачена фруктозою;
ІР – інсулінорезистентність;
НФаУ – Національний фармацевтичний університет;
ОТТГ – оральний тест толерантності до глюкози;
ЛПВГ-ХС – холестерину ліпопротеїдів високої густини;
ЛПНГ-ХС – холестерину ліпопротеїдів низької густини;
ЦД – цукровий діабет;
ЦД2 – цукровий діабет другого типу;
ЦНДЛ – Центральна науково-дослідна лабораторія;
АUC – площа під гіпоглікемічною кривою;
КАТ – каталаза;
ДК – дієнові кон'югати;
GLUT4 – ізоформи глюкозного транспортера;
ГлВ – відновлений глутатіон;
ГП – глутатіонпероксидаза;
ТГ – тригліцериди;
ЗЛ – загальні ліпіди;
ВЖК – вільні жирні кислоти;
JNK – c-Jun N-кінцева кіназа;
МАРК – мітогенактивована кіназа;
NF-карраВ – каппа-підсилювача легких ланцюгів активованих β -клітин;
АФК – активні форми кисню;
СОД – супероксиддисмутаза;
ТБК-АП – тіобарбитурової кислоти активні продукти;
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;

ХГК – хлорогенова кислота;
ГК – галова кислота;
ПЗ – підшлункова залоза;
ПО – панкреатичні островці;
ВЖК – вільні жирні кислоти;
ЛПЛ – ліпопротеїнова ліпаза;
НАЖП – неалкогольна жирова хвороба печінки;
PKC – протеїнкіназа C;
DPP4 – діпептиділпептидаза 4;
GLP1 – глюкагоноподібний пептид;
PI3K – фосфоінозитид 3-кіназа;
GLUT4/2 - глюкозний транспортер тип 4/2;
PPARs – проліфератори пероксисом;
IRS 1/2 – субстрат інсулінового рецептора 1/2.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Цукровий діабет 2 типу є одним із найпоширеніших метаболічних розладів у всьому світі, і його розвиток зумовлений насамперед поєднанням двох основних факторів: порушення секреції інсуліну бета-клітинами підшлункової залози та нездатності чутливих до інсуліну тканин реагувати на інсулін [1]. Незважаючи на те, що діабет є неінфекційним захворюванням, він вважається одним із п'яти найбільш розповсюджених захворювань у світі. У розвинених країнах на цукровий діабет 2 типу хворіє від 5 до 12 відсотків населення. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я та Інтернаціональної федерації діабету, 537 мільйонів дорослих (20-79 років) живуть з цукровим діабетом. Очікується, що це число зросте до 643 мільйонів до 2030 року та 783 мільйонів до 2045 року [2]. Цукровий діабет 2 типу вражає людей різних вікових груп і серйозно впливає на якість життя. Незважаючи на наявність синтетичних пероральних протидіабетичних препаратів, існує нагальна потреба у відкритті та розробці нових антигіперліпідемічних препаратів через розвиток резистентності та побічних ефектів цих препаратів при тривалому застосуванні. Навпаки, джерела рослинного походження з кожним днем стають популярними серед вчених, дослідників і фармацевтичних компаній у всьому світі в пошуках потенційних біологічно активних сполук для відкриття та розробки цільових нових протидіабетичних препаратів, які можуть контролювати діабет, з найменшими небажаними ефектами синтетичних лікарських засобів. Сьогодні фітотерапія стає важливою ланкою лікування та профілактики порушень обміну речовин. Засоби рослинного походження можуть застосовуватися на окремих стадіях цукрового діабету 2 типу як монотерапія в поєднанні з дієтотерапією, а також у комбінації з гіпоглікемічними препаратами. Досліджено, що рослинні глікозиди та флавоноїди можуть мати гіпоглікемічний та антиоксидантний ефект [3].

Перспективною рослинною сировиною, яку можна використати для розробки гіпоглікемічних засобів, є *Actostaphylos uva-ursi* L. (мучниця звичайна) – багаторічна рослина родини вересових (Ericaceae). Доцільність поглибленого вивчення саме листя мучниці звичайної з метою встановлення антигіперглікемічної активності обґрунтовується результатами попередніх досліджень рослин з родини вересових [4]. Актуальним також є можливе посилення гіпоглікемічної активності при модифікації екстракту мучниці звичайної листя амінокислотами, вплив яких на метаболічні процеси на тлі інсулінорезистентності обґрунтовується даними літератури [5].

У Національному фармацевтичному університеті на кафедрі фармакогнозії, під керівництвом доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Кошового отримані сухі екстракти мучниці звичайної листя з імовірною гіпоглікемічною активністю. Таким чином, дослідження потенційних антидіабетичних засобів рослинного походження, які можливо було б застосовувати в комплексній терапії цукрового діабету 2 типу, є перспективною та актуальною темою дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана у межах запланованої науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956).

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – фармакологічне обґрунтування розробки рослинних препаратів з мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот, як перспективного комбінованого антигіперглікемічного засобу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Провести скринінг нових сухих екстрактів з мучниці звичайної листя за гіпоглікемічною активністю на тваринах з нормальним вуглеводним

гомеостазом з метою відбору екстракту для подальшої модифікації, встановити його найбільш ефективну дозу та вивчити гостру токсичність.

2. Провести скринінг за гіпоглікемічною активністю низки екстрактів з мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот на тваринах з нормальним вуглеводним гомеостазом з метою відбору найбільш ефективних екстрактів для подальшого дослідження.

3. Встановити ефективність використання відібраних екстрактів з мучниці звичайної листя на тлі інсулінорезистентності, яка індукована введенням низьких доз синтетичного глюкокортикостероїду.

4. Встановити ефективність використання відібраних екстрактів з мучниці звичайної листя на тлі інсулінорезистентності, яка індукована дієтою, збагаченою фруктозою.

5. Дослідити вплив відібраних екстрактів з мучниці звичайної листя на стан печінки при введенні на тлі експериментальної інсулінорезистентності.

6. З'ясувати вплив відібраних екстрактів з мучниці звичайної листя на ліпідний спектр крові на тлі експериментальної інсулінорезистентності.

7. Дослідити порівняльний вплив відібраних екстрактів з мучниці звичайної листя на структурні зміни та антиоксидантний статус підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності.

Об'єкт дослідження – оптимізація терапії цукрового діабету 2 типу.

Предмет дослідження – гіпоглікемічна, гепатопротекторна, гіполіпідемічна та панкреопротекторна активність сухих екстрактів з мучниці звичайної листя без та з додаванням амінокислот.

Методи дослідження. Для виконання завдань, що поставлені у роботі, використано такі методи досліджень: загальнонаукові (аналіз, узагальнення), фармакологічні (дослідження гіпоглікемічної активності), патофізіологічні (моделювання дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності та інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою), біохімічні (оцінка стану печінки за активністю маркерних ферментів цитолізу та холестазу; дослідження ліпідного профілю крові; активності вільно

радикального окиснення ліпідів та стану системи антиоксидантного захисту в тканинах печінці та підшлунковій залозі), токсикологічні (вивчення гострої токсичності та нешкідливості), морфологічні (гістологічне дослідження тканини підшлункової залози, морфометричний аналіз), статистичні (методи статистичного аналізу результатів).

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше обґрунтована та експериментально доведена доцільність використання сухих екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот для створення нових ефективних та безпечних антигіперглікемічних засобів для корекції інсулінорезистентності та в комплексній терапії цукрового діабету 2 типу.

Вперше проведений скринінг гіпоглікемічної активності нових сухих екстрактів мучниці звичайної листя, за результатом якого здійснений відбір найбільш активного субстрату – екстракту мучниці звичайної листя одержаного 50% етанолом (ПЕ₅₀) та визначена його ефективна доза – 100 мг/кг.

На підставі скринінгових досліджень була вперше досліджена гіпоглікемічна активність модифікованих шляхом додавання амінокислот 10-ти екстрактів мучниці звичайної листя та визначені екстракти, які виявили найбільшу гіпоглікемічну активність. Встановлено, що для подальших досліджень найбільш оптимальною є комбінація ПЕ₅₀ та амінокислот аргініну та цистеїну, які вносилися в трикратному еквімолярному об'ємі відносно загальної кількості фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту (відповідно, ПЕарг та ПЕцис).

Вперше доведено, що на тлі експериментальної інсулінорезистентності, ПЕарг та ПЕцис здатні зменшувати рівень постпрандіальної глікемії в оральному тесті толерантності до глюкози протягом всього експерименту, а через 60 хв після навантаження глюкозою, на 54,15% та 51,73%, відповідно, за умов дексаметазон-індукованої дієти на 42,67% та 40,82%, відповідно, на тлі високофруктозної дієти, що статистично достовірно відрізняється від груп контрольної патології ($p \leq 0,05$).

Вперше вивчено гіполіпідемічну активність досліджуваних екстрактів та встановлена здатність ПЕарг та ПЕцис коригувати дісліпідемію, яка розвивається на тлі експериментальної інсулінорезистентності, що підтверджено нормалізацією показників ліпідного спектру крові.

Вперше встановлено, що за умов різних моделей експериментальної інсулінорезистентності ПЕцис та ПЕарг виявляють гепатопротекторну дію. Вперше виявлено антиоксидантні властивості ПЕарг та ПЕцис, які були досліджені на тлі модельної інсулінорезистентності. За умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності досліджувані субстанції статистично достовірно знижували вміст ТБК-активних продуктів в гомогенаті печінки на 38,6% ПЕарг та на 64,3% ПЕцис проти групи контрольної патології ($p \leq 0,05$). За умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою, ПЕарг та ПЕцис знижували вміст ТБК-активних продуктів в гомогенаті печінки на 42,4% та 44,3%, відповідно ($p \leq 0,05$).

Вперше виконано порівняльну характеристику гіпоглікемічного ефекту, гіполіпідемічної активності, гепатопротекторної та панкреопротекторної дії ПЕарг та ПЕцис на тлі різних моделей експериментальної інсулінорезистентності. За всіма досліджуваними показниками статистично значущих відмінностей між ПЕарг та ПЕцис та референтними препаратами – збір «Арфазетин» та метформін, не виявлено.

За результатами сумісної роботи з дослідниками, що розробили спосіб одержання засобів з гіпоглікемічною активністю було отримані 4 патенти, де було показано гіпоглікемічну та гепатопротекторну дію ПЕарг (Патент України на винахід № № 124042, 2021 р., Патент України на корисну модель № 142210, 2020 р.); та гіпоглікемічну та ліпотропну дію ПЕцис (Патент України на винахід № 124043, 2021 р., Патент України на корисну модель № 142930, 2020 р.).

Практичне значення отриманих результатів. Одержані результати обґрунтовують доцільність створення препаратів з антигіпеглікемічною дією на основі сухих екстрактів з мучниці звичайної листя з додаванням

амінокислот.

Результати експериментальних досліджень за темою дисертаційної роботи впроваджено у науково-педагогічний процес кафедр біологічної хімії Запорізького державного медичного університету (протокол № 3 від 05.07.2021), фармакології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця (протокол № 28 від 23.06.2021), фармації факультету післядипломної освіти Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського (протокол № 9 від 24.06.2021), біологічної хімії Харківського національного медичного університету (протокол № 17 від 29.06.2021) та у наукову діяльність відділу експериментальної фармакології і токсикології Інституту проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України (протокол № 3 від 05.07.2021).

Особистий внесок здобувача. Безпосередньо дисертантом здійснено: патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних даних; виконання експериментів (скринінгові дослідження, моделювання інсулінорезистентності, дослідження гіпоглікемічної активності, визначення гострої токсичності, дослідження показників, які характеризують гепатопротекторну, гіполіпідемічну та антиоксидантну активність, опис та обговорення гістологічних досліджень); статистичну обробку кількісних даних результатів експериментів; систематизацію та оформлення розділів дисертаційної роботи; підготовку публікацій до друку. Визначення мети, завдань дослідження, обговорення та узагальнення результатів здійснено за участю наукового керівника. Співавторами наукових праць є науковий керівник Г. Б. Кравченко та науковці, спільно з якими проведено дослідження: О. А. Красільнікова, О. М. Кошовий, Н. Б. Чайка, А. М. Ковальова, І. В. Кіреєв, О. В. Горяча, С. М. Коваленко, Р. Є. Дармограй, А. Р. Грицик, Ain Raal. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал та основний творчий доробок. Гістологічні дослідження

проведено на базі ЦНДЛ НФаУ за консультативної допомоги та участі к. біол. н., ст. н. сп., Ю. Б. Лар'яновської.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи обговорювалися на таких всеукраїнських та міжнародних наукових заходах: V Національному з'їзді фармакологів України (м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р.); міжнародної науково-практичній конференції «Медичні науки: історія розвитку, сучасний стан та перспективи досліджень (м. Львів, 22-23 вересня 2017 р.); I міжнародної науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 30-31 березня 2017 р.); IV International Scientific-Practical Conference of Students and Young Scientists «Science and Medicine: a Modern View of Youth» (Almaty, 20-21 April, 2017); International Scientific and Practical Conference «Prospects for the Development of Medicine in EU Countries and Ukraine» (Wloclawek, Republic of Poland, 21–22 December 2018); II міжнародної науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 28-29 березня 2018 р.); 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy «Sciences and Practice 2018» (Kaunas, Lithuania, 09 November, 2018); IV міжнародної науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 12-13 березня 2020 р.); науково-практичній конференції «Двадцяті Данилевські читання. «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (м. Харків, 11 лютого 2021 р.); International Scientific and Practical Conference «Topical Issues of Experimental and Clinical Biochemistry» (Kharkiv, Ukraine, 01 October, 2021).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 176 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, 3 розділів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, загальних висновків, списку використаних джерел і 3 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає

160 сторінку друкованого тексту. Робота ілюстрована 18 таблицями та 23 рисунками. Список використаних джерел містить 191 найменування, з них 17 кирилицею та 174 латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2

ТИПУ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО ФАРМАКОКОРЕКЦІЇ

ПРЕПАРАТАМИ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

(Огляд літератури)

1.1 Молекулярні механізми патогенезу та стратегії сучасної терапії цукрового діабету 2 типу

ЦД2 характеризується мультисистемними дисфункціями, пов'язаними з гіперглікемією, яка є прямим наслідком резистентності до інсуліну [6]. ІР – це зниження сприйнятливості інсулін-чутливих тканин, особливо це стосується м'язової, жирової тканини та печінки, до дії інсуліну за умови достатньої його концентрації в крові та є одним із найперших проявів ЦД2 [7].

Розвиток ІР призводить до гіперглікемії, ендотеліальної дисфункції, хронічного запалення, дисбалансу оксидантно-антиоксидантної системи, дисліпідемії та інших метаболічних розладів [8].

Незважаючи на значний прогрес у розумінні молекулярних перетворень і метаболічних шляхів, що характеризують механізми патогенезу ЦД2, залишається ще досить багато питань. Також удосконалюються терапевтичні підходи до профілактики та лікування ЦД2, однак, попит на цільову, безпечну та ефективну терапію залишається.

Секреція інсуліну у відповідь на зміни концентрації глюкози у крові є складним багатоетапним процесом, який вимагає транспорту та окислення глюкози, електрофізіологічних змін та злиття секреторних гранул, що містять інсулін, із плазматичною мембраною бета-клітин. Інсулін не тільки регулює рівень глюкози в крові, прискорюючи поглинання її клітинами, а і контролює метаболізм вуглеводів, білків і ліпідів [9].

Інсулін реалізує свою біологічну дію зв'язуючись зі специфічними тирозин-кіназними рецепторами на мембрані клітин-мішеней та запускає

низку внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, результатом чого є реалізація різноманітних біологічних дій інсуліну на ферменти, білки-транспортери та фактори транскрипції [10].

Взаємодія інсуліну з рецептором викликає конформаційні зміни та швидке автофосфорилування рецептору, що призводить до фосфорилування внутрішньоклітинних білків, таких як субстрати рецептора інсуліну 1 та 2 (insulin receptor substrate, IRS-1, IRS-2) та білків, які позначаються Shc. Білки Shc активують шлях протеїнкінази, активованої Ras/мітогеном (MAPK-activated protein kinases, MAPK), тоді як білки IRS здебільшого активують шлях фосфоінозитид-3-кінази (PI3K)/Akt шляхом залучення та активації PI3K. Шлях PI3K/Akt відповідає за більшість метаболічних ефектів інсуліну, тоді як шлях Ras/MAPK бере участь у регуляції експресії генів і, у співпраці зі шляхом PI3K, у контролі росту та диференціації клітин [11, 12]. У скелетних м'язах і жировій тканині шлях PI3K/Akt (протеїнкіназа B) індукує фосфорилування протеїнкінази, активованої АМФ (AMPK), і експресію транспортера глюкози типу 4 (GLUT4) і його транслокацію з внутрішньоклітинних везикул до клітинної мембрани, що сприяє поглинанню глюкози. У печінці шлях PI3K/Akt пригнічує глікогонеогенез і сприяє синтезу глікогену [13]. Шлях IRSs/PI3K/Akt відіграє важливу роль у формуванні резистентності до інсуліну. IRS1 або IRS2 діють як рецептори, активовані молекулою-месенджером, що є важливим етапом дії інсуліну та причетні до багатьох метаболічних дій інсуліну.

ІР, яка супроводжує ЦД2 характеризується різними дефектами сигнальних шляхів інсуліну. Це стосується зниження кількості рецепторів і активності кіназ, зокрема, кількості і фосфорилування IRS-1 та IRS-2, активності PI3K. Також, спостерігається порушення транслокації транспортерів глюкози та зміни активності внутрішньоклітинних ферментів [14]. Вміст ВЖК, які надходять з адипоцитів, зростає за умов ІР, що, в свою чергу, сприяє подальшому розвитку ІР за рахунок інгібування поглинання глюкози, синтезу глікогену та окислення глюкози при одночасному

збільшенні вироблення глюкози печінкою [15]. Підвищення рівня ВЖК також пов'язані зі зниженням стимульованого інсуліном фосфорилування IRS-1 і пов'язаної з IRS-1 активності PI3K [16]. Підвищення концентрації ВЖК також призводить до накопичення ТГ і метаболітів жирних кислот (діацилгліцерину, ацилів-КоА жирних кислот та церамідів) у м'язах і печінці. Це змінює, як внутрішньоклітинний обмін ліпідів, так і перетворень ліпопротеїнів (ЛП) сироватки крові. Активність ліпопротеїніпази (ЛПЛ) пригнічується, коли клітини не реагують на інсулін належним чином, що опосередковує порушення модифікації ліпідів і аполіпопротеїнів, активацію ліполізу і, як наслідок, зростання вільних жирних кислот (ВЖК) у сироватці крові [17]. Вісцеральна жирова тканина також виділяє надмірну кількість ВЖК, роблячи свій вклад в формування дисліпідемії [18]. Висока концентрація ВЖК в крові та хронічна гіперглікемія суттєво порушують метаболізм ліпідів в печінці. В гепатоцитах накопичуються цераміди та діацилгліцероли, що має токсичну дію. Посилюється синтез ТГ, що зрештою призводить до стеатозу та загибелі клітин. Зв'язок між ІР, ЦД2 та неалкогольною жировою хворобою печінки (НАЖП) не підлягає сумніву [19]. Крім того, високі концентрації ВЖК викликають стрес ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) в адипоцитах, печінці і бета-клітинах, і, як наслідок, ЕПР стрес активує сигнальний шлях JNK-кіназ (c-Jun N-terminal kinases, JNKs), що також робить свій вклад в розвиток ІР [20]. Дисліпідемія при ЦД2 зазвичай характеризується підвищенням ЛПДНЩ. Утворення ЛПДНЩ посилюється інсуліном, і цей ефект, здається, зберігається, коли інші ефекти інсуліну гальмуються ІР. Вміст ЛПНЩ, які є атерогенною фракцією, часто підвищується при ІР та гіперінсулініемією разом зі зниженням ЛПВЩ, звідси, такі зміни є однією з причин серцево-судинних ускладнень при діабеті [21].

Приймаючи до уваги вищесказане, корекція дисліпідемії так само важлива, як і гіперглікемії при довгостроковій терапії ЦД2 [22].

Метаболічні зміни, які пов'язані з ЦД2 добре охарактеризовані клінічними та експериментальними дослідженнями. Декілька механізмів

пояснюють патогенез і прогресування ЦД2. По-перше, накопичення кінцевих продуктів глікації (advanced glycation endproducts, AGEs) призводить до хронічного глікування білків і пошкодження тканин [23]. По-друге, активується поліольний шлях, що призводить до утворення сорбітолу, зниження активності альдозоредуктази та Na^+/K^+ -АТФ-ази. Третя подія – це активація ізоформ протеїнкінази С (РКС). Посилене перетворення сорбітолу на фруктозу під дією сорбітол-дегідрогенази призводить до збільшення рівня діацилгліцеролу, який у свою чергу активує протеїнкіназу С (РКС) [24]. І, нарешті, четверта подія – підвищена активність гексозамінового шляху, наслідком активності якого є глікування білків, наприклад, таких як NO-синтаза ендотелію [25]. До недавнього часу для цих механізмів не було очевидного спільного елементу, який об'єднує. Однак, досить швидко з'ясували, що наслідки цих процесів спричиняють внутрішньоклітинний оксидативний стрес [26].

Безперечно, оксидативний стрес є одним з головних тригерів метаболічних розладів, що формують стан ІР, але досі залишається дискусійним, чи є він просто сукупністю реакцій, чи клінічною сутністю, яка лежить в основі різних патофізіологічних факторів [27]. Останні дослідження показали, що накопичення активних форм кисню (АФК) та активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) відіграє одну з головних ролей в патогенезі ЦД2 [28]. Майже всі клітинні компоненти хімічно змінюються через вплив АФК, що в кінцевому підсумку призводить до ПОЛ. ПОЛ є основним причинним фактором розвитку оксидативного стресу, який призводить до розвитку патофізіологічної картини ЦД2 та пов'язаних із ним безліч метаболічних порушень, більшою мірою обумовлених порушеннями сигнальних шляхів і посилює гіперглікемію ускладнень [29, 30].

Здатність організму запобігати розвитку ЦД2 значною мірою залежить від адаптивної здатності бета-клітин ПЗ підтримувати зростаючу секрецію інсуліну [31]. Неможливість підтримувати достатньо високий рівень інсуліну призводить до порушення толерантності до глюкози. Збільшення

невідповідності між ескалацією резистентності до інсуліну та неадекватною компенсаторною гіперінсулінемією спричиняє прогресування ІР у явний ЦД2. До того часу, коли розвивається ЦД2, резистентність до інсуліну, майже повністю встановлена. Однак, гіперглікемія продовжує посилюватися через дедалі більше порушену функцію бета-клітин [32].

Таким чином, ми можемо виділити два сучасних підходи до стратегії лікування ЦД2 або профілактики ускладнень, спричинених гіперглікемією. По-перше, нейтралізація специфічних глюкотоксинів, таких як АФК, і по-друге, ідентифікація та нормалізація активності сигнальних шляхів інсуліну.

В даний час досліджується можливість впливу саме на молекулярні посередники для посилення опосередкованої інсуліном передачі сигналу. За останні роки було описано багато потенційних цілей втручання та комбінацій із терапевтичною активністю.

Наприклад, серинкінази можуть фосфорилювати і таким чином інгібувати фосфорилювання тирозину IRS-1, тому використання цих кіназ і специфічних інгібіторів представляє багату область для протидіабетичної терапії [33]. Глікогенсинтаза-кіназа-3 (GSK-3) відіграє очевидну роль у протидії інсуліну шляхом пригнічення активації глікогенсинтази та подальшого накопичення глікогену в м'язах. Нещодавні результати з вибраними інгібіторами активності GSK-3 *in vivo* дійсно можуть підсилити дію інсуліну [34]. Домен Sh2, що містить інозитол 5-фосфатазу типу 2 (SHIP 2), може сприяти дефосфорилюванню ключових фосфоліпідів, наприклад, фосфатидилінозитолфосфат, який утворюється опосередкованою інсуліном активацією PI3K [35].

Інші передбачувані негативні регулятори сигналізації інсуліну нещодавно були залучені як незалежні мішені для ліків. Було продемонстровано значення AMPK сигнального шляху у підвищенні чутливості до інсуліну та в інгібуванні оксидативного стресу, а також апоптозу бета-клітин. Також підкреслене важливість перекресних перешкод шляху AMPK з ключовими молекулярними шляхами, а саме P13K/Akt, НАДФН-

оксидази 4 (NADPH Oxidase 4, NOX4) та ядерного фактору каппа-підсилювачу легкого ланцюга активованих В-клітин (NF- κ B) [36].

Ці висновки також підтверджуються дослідженнями, де наголошується на важливій участі AMPK, припускаючи вплив IP-захисні наслідки [37].

Роль GLUT4 як фактора, що бере участь у запобіганні та полегшенні IP-паттернів, головним чином через відновлення шляху IRS/Akt/GLUT4, була доведена Prasatthong та ін. . Не тільки GLUT4 привернув увагу останнім часом, але також було показано, що GLUT2 є механізмом дії для використання берберину [38].

Іншим заслуговуючим на увагу механізмом, є інгібування дипептидилпептидази 4 (DPP-4), ферменту, який діє на інкретинові гормони, головним чином глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) та шлунковий інгібуючий пептид, які підтримують гомеостаз глюкози шляхом збільшення секреції інсуліну та зниження секреції глюкагону [39].

Пептидні кишкові гормони, GLP-1 та шлунковий інгібуючий пептид (GIP) потенціюють стимульовану глюкозою секрецію інсуліну через відповідні рецептори бета-клітин ПЗ [40]. Оскільки обидва гормони зазнають швидкої деградації під дією DPP-4, рекомендовано використання модифікованих пептидних агоністів GLP-1, стійких до цього ферменту. Таким чином, розробка аналогів GLP-1 та інгібіторів DPP-4, ймовірно, призведе до нових важливих терапевтичних підходів, які могли б уникнути гіпоглікемії, збільшення ваги та побічних ефектів, пов'язаних із застосуванням сульфонілсечовини [41].

Активация рецепторів, що активуються проліфераторами пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) представляє механізм, який можна використати для усунення або запобігання ліпотоксичності. PPAR-g впливає на транскрипцію генів у жировій тканині, що призводить до індукції генів адипоцитів, таких як гени ліпопротеїнліпази та транспортера жирних кислот-1, що призводить до покращення дії інсуліну разом зі зниженням рівня ТГ і ВЖК [42]. Тіазолідиндіони, агоністи PPAR γ , мають вирішальне значення

для модуляції метаболічного гомеостазу глюкози та ліпідів і головним чином підвищують чутливість до інсуліну [43].

Поліпшення дії інсуліну є відносно новою концепцією лікування діабету. До фармакологічних засобів, що покращують дію інсуліну, належать метформін, серотонінергіки проти ожиріння та, можливо, бенфлюорекс. Нові сполуки, спрямовані на покращення дії інсуліну, знаходяться в розробці та включають похідні тiazолідиндіону (відомі як «інсулінові сенсibilізатори»), інгібітори ліполізу жирової тканини (наприклад, аципімокс) та інгібітори окислення вільних жирних кислот (наприклад, етоксір).

Жодні ліки не схвалені спеціально для лікування резистентності до інсуліну. Проте ліки від діабету, такі як метформін і тiazолідиндіони, є сенсibilізаторами інсуліну, які знижують рівень глюкози в крові, принаймні частково, шляхом зниження резистентності до інсуліну.

1.2 Механізми дії сучасних лікарських засобів, які застосовуються для фармакотерапії цукрового діабету 2 типу та його ускладнень

Лікування пацієнтів із ЦД2 включає навчання способу життя, моніторинг мікро- та макросудинних ускладнень, ретельний контроль рівня глюкози в крові, мінімізацію серцево-судинних та інших факторів ризику та уникнення прийому лікарських препаратів, які можуть посилити аномалії метаболізму інсуліну чи ліпідів. Однак, засоби сучасної фармакотерапії найчастіше використовують для постійного глікемічного контролю [44].

Препаратами першої лінії, які призначаються лікарями є похідні сульфонілсечовини та бігуанідів. Не дивлячись на те, що похідні сульфонілсечовини використовуються в клінічній практиці вже декілька десятиліть, вони залишаються найбільш вживаними пероральними цукрознижуючими препаратами. Бігуаніди, зокрема метформін, також застосовуються в медичній практиці багато років для лікуванні ЦД2.

Усі похідні сульфонілсечовини містять структуру фенілсульфонілсечовини, яка саме і надає гіпоглікемічний ефект. Похідні сульфонілсечовини зв'язуються з АТФ-чутливими калієвими каналами (K) на бета-клітинах підшлункової залози та інгібують їх. В результаті зменшується відтік калію, а мембрана бета-клітин деполяризується. Деполяризація мембрани викликає відкриття кальцієвих каналів, що призводить до припливу кальцію та збільшення внутрішньоклітинного кальцію, що стимулює секрецію інсуліну з бета-клітин підшлункової залози [45]. Тобто, похідні сульфонілсечовини безпосередньо стимулюють вивільнення інсуліну з бета-клітин ПЗ і тим самим знижують концентрацію глюкози в крові. Оскільки вони діють, стимулюючи секрецію інсуліну, вони корисні лише для пацієнтів з деякою функцією бета-клітин [46]. Похідні сульфонілсечовини також знижують рівень глюкози в сироватці крові шляхом зниження метаболізму інсуліну в печінці, зниження секреції глюкагону та підвищення чутливості периферичних тканин до інсуліну [47]. Побічні ефекти можуть включати збільшення ваги та гіпоглікемію, пов'язану з навмисним або випадковим передозуванням похідних сульфонілсечовини, та захворювання очей [48].

Окрім регуляції секреції інсуліну, можна згадати ефекти, можливо пов'язані з протидіабетичною дією сульфонілсечовини. Це може бути прямий вплив на печінку – пригнічення тригліцеридліпази; обмеження руху аніонного субстрату через внутрішню мембрану мітохондрій печінки; гальмування синтезу кетонових тіл; пригнічення глюконеогенезу. Або прямий вплив на жирову тканину – пригнічення ліполізу; інгібування тригліцеридліпази; підвищене поглинання та окислення глюкози [49].

Гіпоглікемія може виникнути, оскільки ці препарати потенціюють вивільнення інсуліну, навіть якщо концентрація глюкози нижча за нормальний поріг стимульованого глюкозою вивільнення інсуліну (<5 ммоль/л) [50].

Клініцисти часто призначають сульфонілсечовину як доповнення до метформіну. Ця комбінація спрямована на різні механізми дії та покращує

контроль рівня глюкози; сульфонілсечовини стимулюють секрецію інсуліну, тоді як метформін підвищує чутливість до інсуліну.

Хімічно метформін – це гідрохлорид 1,1-диметилбігуаніду, механізм дії якого подібний до інших бігуанідів. Метформін є препаратом, який має декілька тканин-мішеней та діє за кількома молекулярними механізмами. З фізіологічної точки зору метформін прямо чи опосередковано впливає на печінку, гальмуючи глюконеогенез, і впливає на ентероцити, стимулюючи всмоктування глюкози та активуючи глюкагоноподібний пептид (glucagon-like peptide-1, GLP-1) [51]. На молекулярному рівні метформін пригнічує мітохондріальний дихальний ланцюг у печінці, що призводить до активації 5'АМФ-активованої протеїнкінази (5'AMP-activated protein kinase, AMPK), підвищення чутливості до інсуліну (через вплив на метаболізм ТГ) і зниження вмісту циклічного аденозінмонофосфату (цАМФ), таким чином зменшуючи експресію глюконеогенних ферментів. Метформін також має AMPK - незалежний вплив на печінку, коли діє шляхом інгібування фруктозо-1,6-бісфосфатази АМФ. Покращує чутливість до інсуліну за рахунок підвищення периферичного поглинання та використання глюкози [52, 53]. Побічні ефекти: найбільш частими є шлунково-кишкові, такі як анорексія, нудота, дискомфорт у животі та діарея; вони зазвичай легкі та минулі. Крім того, метформін знижує всмоктування вітаміну В12 в кишечнику. Рідше зустрічається лактатацидоз [54].

Розуміння того, що тривала гіперглікемія безпосередньо пов'язана з багаточисленними ускладненнями, призвело до збільшення готовності клініцистів застосовувати інтенсивне лікування для досягнення глікемії, для чого може знадобитися комбінація препаратів для діабету. За останні роки розширився спектр препаратів із різними механізмами дії.

Серед таких засобів виділяються інгібітори альфа-глюкозидази. Ці препарати зменшують постпрандіальну глікемію шляхом конкурентного та оборотного інгібування кишкової α -глюкозидази, таким чином затримуючи перетравлення вуглеводів і знижуючи швидкість всмоктування глюкози.

Багато інгібіторів α -глюкозидази було виявлено синтетичними шляхами, а також з природних джерел, включаючи рослини, гриби та бактерії [55].

Дія тіазолідиндіонів значною мірою опосередковується стимуляцією ядерного рецептора, який активований проліфератором пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ), тобто вони є селективними агоністами PPAR γ . Їхня дія сприяє перерозподілу надлишку жирних кислот у периферичний жир. Це зменшує наявність ВЖК у кровообігу, а також у печінці та м'язах, таким чином запобігаючи гіперліпідемії та покращуючи чутливість до інсуліну. Також є дані, що тіазолідиндіони впливають на секрецію адипокіну [56].

Меглітиніди є стимуляторами секреції інсуліну значно коротшої дії, ніж похідні сульфонілсечовини, при цьому препрандіальне дозування потенційно може досягти більшого фізіологічного вивільнення інсуліну та меншого ризику гіпоглікемії. Хоча меглітиніди значно дорожчі за сульфонілсечовини, вони схожі за своєю глікемічною клінічною ефективністю. Найчастішим побічним ефектом меглітинідів є гіпоглікемія [57]. Агоністи рецепторів глюкагоноподібного пептиду 1 (GLP-1) та інгібітори дипептидилдипептидази 4 (DDP-4) збільшують секрецію інсуліну та зменшують гіперглюкагонемію, тим самим знижуючи гіперглікемію [58].

Глюкагоноподібний пептид (Glucagon-like Peptide-1, GLP-1) – гормон, який синтезується та виділяється ентероендокринними клітинами, цей гормон стимулює секрецію глюкозозалежного інсуліну бета-клітинами підшлункової залози. Дослідження показують, що лікування ЦД2 за допомогою GLP-1 посилює активність бета-клітин, нормалізує рівень глюкози в крові та відновлює секрецію інсуліну, тому GLP-1 та його рецептори є терапевтичними мішенями для лікування ЦД2. GLP-1 додатково індукує синтез глікогену в печінці. Він також покращує окислення жирних кислот і видалення ліпідів із гепатоцитів, зменшуючи ліпогенез *de novo* [59].

Інгібітори транспорту натрію-глюкози 2 (sodium-glucose transport protein 2, SGLT-2) знижують рівень глюкози в крові через збільшення ниркової

екскреції глюкози з другорядною перевагою зниження токсичності глюкози. Вони збільшують глюкози в печінці, секрецію глюкагону, кетогенез і окислення ліпідів. Значним побічним ефектом їх лікування є помірна втрата ваги, зниження артеріального тиску та помірне зниження інсулінорезистентності [60].

Інгібіторії α -глікозидази пригнічують фермент α -глюкозидазу на щітковій облямівці кишкового епітелію, таким чином блокуючи всмоктування вуглеводів у тонкій кишці. Вони вводяться з першим шматком їжі, що містить вуглеводи, і обмежують постпрандіальну гіперглікемію, не викликаючи гіпоглікемії. Їх використання було обмежене частими скаргами на шлунково-кишковий тракт, необхідністю вводити препарати на початку кожного прийому їжі, лише помірним зниженням рівня HbA1c і обмеженим впливом на рівень глюкози натще. Побічні ефекти інгібіторів α -глікозидази з боку шлунково-кишкового тракту є фізіологічними (метеоризм, взуття живота – виникають при надлишковому надходженні вуглеводів) і зникають через 2-3 місяці на фоні непереривного прийому препарату [61].

Хоча синтетичні пероральні гіпоглікемічні препарати поряд з інсуліном є основним способом контролю діабету, вони не здатні повністю змінити перебіг його ускладнень і ще більше погіршують його через те, що вони також демонструють помітні побічні ефекти. Це є основною силою для відкриття альтернативних джерел протидіабетичних засобів [62]. Незважаючи на значний прогрес, досягнутий у лікуванні цукрового діабету за допомогою пероральних протидіабетичних засобів за останні три десятиліття, результати лікування хворих на діабет все ще далекі від досконалості. Повідомлялося про декілька недоліків, пов'язаних із застосуванням цих пероральних гіпоглікемічних засобів, включаючи резистентність до ліків (зниження ефективності), побічні ефекти та навіть токсичність. Наприклад, похідні сульфонілсечовини втрачають свою ефективність після 6 років лікування приблизно у 44% пацієнтів, тоді як повідомляється, що цукрознижувальні препарати не здатні контролювати гіперліпідемію [63]. Через кілька обмежень,

пов'язаних із застосуванням існуючих синтетичних протидіабетичних препаратів, пошук нових протидіабетичних препаратів із природного джерела триває [64].

1.3 Роль фітотерапії в профілактиці та комплексному лікуванні цукрового діабету 2 типу та перспективи створення нових антигіперглікемічних засобів рослинного походження

Неналежна регуляція рівня глюкози в крові має серйозні наслідки, результатом яких є численні ускладнення ЦД2. Пероральні гіпоглікемічні препарати, які були обговорені вище, є ефективними саме щодо регуляції рівня глюкози, але також мають неминучі побічні ефекти та проблеми з регуляцією комплексу метаболічних порушень. Лікарські рослини можуть виступати альтернативним джерелом субстанцій, які мають цілий спектр ефектів. Сприятливий потенціал компонентів, які містяться в рослинах, забезпечується комбінованою та узгодженою дією їхнього профілю біологічно активних сполук.

В науковій літературі описані різноманітні механізми, що пояснюють корисні ефекти фітохімічних речовин, такі як регуляція метаболізму глюкози та ліпідів, секреція інсуліну, стимуляція клітин, сигнальний шлях NF- κ B, інгібування глюконеогенних ферментів та антиоксидантна дія [65]. Тому дослідження фітохімічних речовин, які мають різноманітні антидіабетичні ефекти були дуже активними в останні кілька десятиліть. Лікування ЦД2 сполуками рослинного походження, які є доступними та не потребують трудомісткого фармацевтичного синтезу, виглядає дуже привабливим.

Численні наукові дані показали, що поліфеноли можуть взаємодіяти з кількома молекулярними шляхами, які беруть участь у метаболізмі глюкози. Протягом багатьох років вплив кількох підкласів флавоноїдів на інсуліновий сигнальний шлях широко оцінювався в експериментах *in vitro* і на моделях на тваринах [66]. Зокрема, дослідження показали, що флаваноли, флавоноли,

флаванони, антоціани та ізофлавоноїди, а також їх основні харчові джерела індукують поглинання глюкози скелетною та жировою тканинами та знижують вироблення та вихід глюкози печінкою. Ці дані продемонстрували, що флавоноїди здебільшого активують PI3K/Akt шлях, сприяючи транслокації GLUT4, пригнічуючи глюконеогенез і стимулюючи синтез глікогену. Крім того, позитивний вплив флавоноїдів на сигнальні шляхи інсуліну підтверджується даними, отриманими в ході клінічних досліджень, оскільки вони свідчать про те, що споживання їжі, багатої флавоноїдами, може знижувати резистентність до інсуліну. Однак, деякі результати є суперечливими, що пояснюється відмінностями в методології, концентраціях флавоноїдів і спостережуваних популяціях [67].

Повідомляється, що вторинні метаболіти рослин, широко відомі як фітохімічні речовини, мають велику користь при лікуванні ЦД2. Їхня дія на інсулінові сигнальні шляхи через стимуляцію транслокації GLUT4 має вирішальне значення для розуміння патогенезу цього захворювання в процесі лікування. [68].

Рослинні поліфеноли мають виражені антиоксидантні властивості, з чим, значною мірою, і пов'язані їх потенційні антидіабетичні ефекти. Вплив флавоноїдів визначається взаємодією з клітинними мембранами, що змінює фазовий стан ліпідів мембрани та їхню структурну організацію [69]. Не викликає сумніву вплив поліфенолів на експресію ядерних і цитоплазматичних білків. Важливою складовою активності біофлавоноїдів представляється їхня участь у сигнальних системах клітини [70].

Екзогенні рослинні антиоксидантні сполуки в дієтичних продуктах включають флавоноїди, антоціани та поліфенольні речовини, які діють як поглинач АФК. Пряма взаємодія АФК з неферментативними антиоксидантами базується на властивостях хімічної структури. Чимало наукових досліджень продемонстрували ефективність рослин та окремих речовин рослинного походження для корекції ЦД2 та його ускладнень, однак дослідження в цій галузі необхідні і є актуальними [71].

В даному огляді ми приділимо більше уваги саме на ті рослинні компоненти, які містяться в листях мучниці звичайної і, відповідно, в екстрактах, отриманих з цієї сировини.

Арбутин – природний гідрохіноновий глікозид, який міститься в багатьох рослинних продуктах, відомий як інгібітор тирозінази, що інгібує синтез меланіну крім того, добре досліджена його бактерицидна та протизапальна активність. Арбутин виявляє антиоксидантну активність та здатний поглинати вільні радикали, що продемонстровано в експериментах *in vitro* та *in vivo*. Також, як антиоксидант, пригнічує ПОЛ в лізосомальних мембранах, що призводить до зниження активності лізосомальних ферментів [72, 73]. Наприклад, дослідження виявили захисну дію арбутину на серцеву тканину за умов оксидативного стресу, спричиненого ЦД2, завдяки його антиоксидантним властивостям [74]. Була продемонстрована здатність арбутину зменшувати гіперглікемію, дисліпідемію та резистентність до інсуліну. Ці ефекти були пов'язані з підвищенням рівня PPAR γ в печінці. Арбутин інгібував α -глюкозидазу *in vitro* та дослідження *in silico* показали здатність арбутину зв'язувати PPAR γ , гексокіназу та α -глюкозидазу [75].

Підсумовуючи, арбутин ефективно знижував толерантність до глюкози, резистентність до інсуліну, дисліпідемію, запалення та окислювальний стрес, уповільнював всмоктування глюкози, а також модулював активність ферментів, що метаболізують вуглеводи, та PPAR γ при ЦД2 у щурів [76]. Також була виявлена здатність арбутину модулювати кілька сигнальних шляхів, таких як IGF-1R, AMPK та експресію мРНК GLUT4. Введення арбутину призводило до зниження рівнів ТГ, ЛПДНЩ та ЛПНЩ, одночасно підвищуючи ЛПВЩ [77].

Галова кислота (ГК) – поширена в природі фенольна кислота, яка міститься в багатьох рослинах, в тому числі в органах мучниці звичайної. Протягом останніх років було проведено цілий ряд досліджень, які виявили гіпоглікемічну активність ГК *in vitro* та *in vivo*. Введення ГК підвищувало експресію печінкових інсулінових сигнальних білків, таких як PI3K/Akt, IRS1

та GLUT2 [78]. Інші ефекти ГА, які спостерігали стосувалися підвищення інгібіторної активності цих α -амілази та α -глюкозидази у щурів із ЦД2 при комбінованому введення ГА з гіпоглікемічними препаратами [79]. Також необхідно відмітити сприятливий ефект ГК проти діабетичного ураження печінки. Важливо, що ГК посилювала експресію GLP-1 імунореактивних клітин у термінальній клубовій кишці. Результати досліджень виявили, що ГК може зменшити індуковане ЦД2 пошкодження печінки активуючи експресію печінкової мРНК для GLUT-4, протоонкогену Wnt1 та бета-катеніну з одночасним інгібуючим ефектом на підвищену експресію сигнальних регуляторних кіназ (signal-regulated kinase 1 / 2) ERK1/2/NF- κ B [80].

Вивчення впливу ГА на моделі НАЖХП, індукованою фруктозою, показало, що введення ГА сприяло відновленню фосфорилювання протеїнкінази α (AMPK α), що активується АМФ, що призвело до зниження регуляції проліпогенних факторів, включаючи протеїн-1, що зв'язує регуляторний елемент стеролу (SREBP-1), синтазу жирних кислот (FASN) і ацетил-КоА в гепатоцитах *in vivo* та *in vitro*. Ці результати свідчать про те, що ГА полегшує індукований фруктозою гепатостеатоз шляхом стримування ліпогенезу в печінці через AMPK-залежне пригнічення каскаду SREBP-1/ACC/FASN [81].

Фенольні сполуки рослинного походження, до яких відносяться гідроксикоричні кислоти, серед яких є *хлорогенова кислота* (ХГК) та її ізомери, виявляють антидіабетичні ефекти опосередковані такими механізмами, як активація шляху AMPK, інгібування α -глюкозидази/ α -амілази та активація PPAR, що поліпшує чутливість до інсуліну. Крім того, ці сполуки можуть бути використані як альтернативні сполуки для корекції супутніх захворювань ЦД2 [82].

Багато дослідників обговорювали можливий механізм антидіабетичної активності ХГК. В експериментах, які були проведені на мишах *Leprdb/db* досліджували шляхи, через які ХГК виявляє антидіабетичний ефект. Автори припустили, що ХГК стимулює поглинання глюкози клітинами скелетних

м'язів через активацію шляху AMPK [83]. Для ХГК показаний інгібуючий вплив на гліюконеогенез в гепатоцитах, що призвело до зниження рівня глюкози в плазмі крові, покращення чутливості до інсуліну та толерантності до глюкози. ХГК інгібує α -амілазу та α -глюкозидазу [84].

У жировій тканині похідні гідроксикоричної кислоти інгібують інфільтрацію макрофагів і активацію NF- κ B у тварин із ожирінням. Крім того, похідні гідроксикоричної кислоти запобігають диференціації адипоцитів і корегують ліпідний профіль у експериментальних тварин [85].

Введення ХГК зменшувало зниження експресії IRS-1, викликане високою концентрацією інсуліну, запобігало інактивації шляху PI3K/Akt та зниженню рівня GLUT4, що спостерігається при високій концентрації глюкози в крові. Більш того, експерименти на тваринах показали, що це пригнічення може бути опосередковано активацією AMPK. Не можна не згадати про антиоксидантні властивості ХГК: збільшення вмісту ГлВ та активності ГП, та як результат зменшення АФК [86].

Використання амінокислот як окремих лікарських засобів або компонентів їхніх компонентів є важливим варіантом для корекції метаболічних порушень. Деякі з найбільш відомих областей терапевтичного застосування амінокислот — це лікування метаболізму мозку та дисбалансу нейротрансмісії. Інші сфери, в яких амінокислоти також знаходять ключове застосування, — це імунокорекція, лікування серцево-судинної системи та шлунково-кишкового тракту, лікування захворювань печінки, втоми, пошкодження скелетних м'язів, профілактика раку, опіків, травм і сепсису, захворювань сечі та діабету [87]. Однак, в даному огляді ми хотіли би привернути увагу до застосування таких амінокислот, як L-аргінін (аргінін) та L-цистеїн (цистеїн).

Зростаюча кількість досліджень свідчить про те, що додавання аргініну може сприяти зменшенню ваги при ожирінні, зниженню артеріального тиску, перешкоджати окисленню та нормалізувати ЕД, що призводить до ремісії ЦД2. Можливий сигнальний шлях цих ефектів, ймовірно, включає шлях

аргінін-NO, за допомогою якого може бути активований цілий ряд сигнальних білків. У пацієнтів з ЦД2, як правило, виявляється ЕД, яка пов'язана з гіперхолестеринемією, і дефіцитом NO. Взагалі цілий ряд дослідників вважає, аргінін може мати потенціал для запобігання та/або полегшення ЦД2 шляхом відновлення чутливості до інсуліну [88]. Останні дані свідчать про те, що аргінін стимулює секрецію інсуліну за рахунок вивільнення GLP-1 було продемонстроване покращення толерантності до глюкози при пероральному прийомі аргініну залежить від передачі сигналів GLP-1R. Таким чином, аргінін приймає участь в опосередкованому регулюванні метаболізму глюкози шляхом індукції вивільнення GLP-1, що може забезпечити альтернативний терапевтичний підхід до корекції метаболічних розладів [89].

Хворі на ЦД2 мають нижчі рівні цистеїну та ГлВ в крові. Синтез Гл знижується у пацієнтів із неконтрольованим ЦД2, що пов'язаний з підвищеним оксидативним стресом. Дослідження довели, що добавка цистеїну позитивно регулює вплив інсуліну на метаболізм Гл та глюкози. Вірогідно, що добавка цистеїну сприяє дії інсуліну за рахунок зниження рівня АФК і підвищення рівня ГлВ та GLUT-4 [90].

Гл являє собою трипептид, що синтезується з амінокислот глутамату, гліцину та цистеїну в цитозолі і транспортується до інших клітинних компартментів. Як низькомолекулярний тиолсодержащий антиоксидант Гл присутній у всіх еукаріотичних клітинах. Гл необхідний для функціонування ферментів ГП, які детоксикують H_2O_2 , пероксиди ліпідів або інші органічні пероксиди. Серед різних АФК H_2O_2 виявляє низьку загальну реакційну здатність, але відносно високу селективність по відношенню до специфічних тіолових груп (R-SH) залишків цистеїну [91].

Введення цистеїну знижує рівень глікемії та прозапальних цитокінів в крові, що сприяє зменшенню запалення судин і серцево-судинних захворювань при діабеті [92, 93].

ЦД2 – хронічне прогресуюче метаболічне захворювання, що характеризується хронічною гіперглікемією. Хоча його основними

фізіологічними аномаліями є резистентність до інсуліну та порушення секреції інсуліну, специфічні детермінанти цих метаболічних дефектів залишаються невизначеними. Існують складні взаємодії між генетичними, епігенетичними, екологічними та поведінковими факторами, які сприяють розвитку діабету. Для лікування ЦД2 використовувалися немедикаментозні та фармакологічні втручання. За останні роки дослідження почали фокусуватися на пошуку нових препаратів, які безпосередньо можуть впливати на сигнальні метаболічні шляхи, та такі що мають антиоксидантні властивості, оскільки було виявлено, що оксидативний стрес відіграє вирішальну роль у патогенезі ЦД2.

Таким чином, розробка антигіперглікемічних препаратів, які здатні підвищувати чутливість до інсуліну, є потенційною терапевтичною метою.

Висновки до розділу I

1. ІР відіграє вирішальну роль у захворюваності та смертності серед хворих на ЦД2, і тому необхідні нові терапевтичні стратегії, щоб забезпечити пацієнтів кращим доглядом і більш ефективним лікуванням.

2. Для лікування ІР запропоновано широкий спектр природних сполук. Багато з них успішно використовувалися на стадії фундаментальної науки, і їх можна розглядати як молекули, які мають перспективу бути використаними для створення нових лікарських препаратів.

3. В огляді, обмеженому рамками дослідження, узагальнена роль фітохімічних речовин та амінокислот у профілактиці та лікуванні діабету на основі клінічних та експериментальних досліджень, проведених протягом останнього десятиліття.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На теперішній час наявна необхідність пошуку та розширення асортименту антигіперглікемічних засобів рослинного походження, які відповідають одночасно вимогам ефективності та безпечності. За останні роки накопичені дані про високу біологічну активність компонентів як листя, так і плодів рослин родини вересових (*Ericaceae*), які виявляють гіпоглікемічну активність та сприяють зменшенню ускладнень ЦД2. Це і стало обґрунтуванням проведення комплексу фармакологічних досліджень з вивчення ефективності поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної при моделюванні ІР.

Досліджено фармакологічну активність поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi*): спиртовий 50% (ПЕ₅₀), спиртовий 90% (ПЕ₉₀) та водний екстракт (ПЕв) та екстракти на основі модифікованого ПЕ₅₀ з додаванням амінокислот, послідовно введені згідно з планом експерименту. Екстракти були отримані шляхом модифікації з різними амінокислотами, які вносилися в трикратному еквімолярному об'ємі відносно загальної кількості фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту [94, 95]. Нові поліфенольні екстракти отримали наступні позначення відповідно до внесеної амінокислоти: цистеїн – ПЕцис; фенілаланін – ПЕфен; валін – ПЕвал; гліцин – ПЕглі; аланін – ПЕала; лейцин – ПЕлей; гістидин – ПЕгіс; лізин – ПЕліз; аргінін – ПЕарг; глютамінова кислота – ПЕглу. Досліджувані уперше отримані екстракти були виготовлені на кафедрі фармакогнозії НФаУ під керівництвом д. фарм. н., проф. О. М Кошового. Склад був підтверджений за допомогою сучасних фізико-хімічних методів (див. Таблиця 2.1) [96, 97].

Таблиця 2.1.

Результати аналізу сухих екстрактів з листя мучниці звичайної

Речовина	Вміст речовини, мг/100г										
	ПЕ ₅₀	ПЕ _{цис}	ПЕ _{фен}	ПЕ _{вал}	ПЕ _{глі}	ПЕ _{ала}	ПЕ _{лей}	ПЕ _{гіс}	ПЕ _{ліз}	ПЕ _{арг}	ПЕ _{глу}
Арбутин	2956,72± 57,9	2689,89 ±65,6	2819,81 ±49,8	2661,12 ±62,3	2778,65 ±58,1	2720,17 ±64,1	2837,70 ±65,9	2542,78 ±65,0	5446,62 ±61,5	2572,35 ±63,1	2551,12 63,1±
Фенолкарбонові кислоти											
Галова кислота	147,31 ±4,2	135,52 ±3,6	140,49 ±3,9	131,11 ±3,3	123,25 ±3,6	135,51 ±5,1	139,91 ±3,7	127,01 ±4,8	125,31 ±3,9	128,16 5,2±	126,68 ±4,4
Гідроксикоричні кислоти											
Кавова кислота	87,12 ±3,6	79,26 ±2,9	81,03 ±2,9	78,44 ±3,2	81,89 ±4,1	80,15 ±3,0	83,63 ±3,1	74,92 ±5,6	75,14 ±4,4	75,79 ±4,6	74,62 ±5,1
<i>n</i> -Кумарова кислота	42,36 ±2,8	38,13 ±2,6	39,42 ±3,1	38,54 ±2,4	39,83 ±2,5	39,83 ±2,5	40,66 ±2,5	36,42 ±3,2	36,02 ±2,5	37,02 ±3,2	36,16 ±2,7
Хлорогенова кислота	214,23 ±3,8	194,84 ±4,3	194,92 ±8,6	192,91 ±3,5	201,35 ±3,0	197,23 ±3,8	205,54 ±4,0	184,24 ±3,0	182,09 ±3,5	186,38 ±4,1	184,24 ±5,3
Протокатехова кислота	14,01 ±1,2	12,88 ±1,8	13,32 ±1,9	12,64 ±1,5	13,17 ±1,1	12,88 ±1,0	13,44 ±1,8	12,05 ±1,5	11,90 ±0,7	12,19 ±1,6	12,05 ±1,9
Флавоноїди											
Рутин	11,82 ±0,03	10,99 ±0,05	11,23 ±0,02	10,65 ±0,06	11,11 ±0,06	10,87 ±0,05	11,34 ±0,04	10,16 ±0,03	10,05 ±0,06	10,29 0,08±	10,16 ±0,06
Гіперозид	446,23 ±13,2	412,21 ±10,9	425,57 ±12,7	405,36 ±16,5	419,46 ±13,8	410,53 ±14,1	428,38 ±10,5	384,03 ±10,9	379,23 ±13,2	388,30 ±22,7	383,76 ±18,7
Кверцитрин	14,55 ±0,5	13,41 ±0,6	13,87 ±0,02	13,12 ±0,4	13,67 ±0,4	13,38 ±0,3	13,97 ±0,4	12,51 ±0,8	12,37 ±0,5	12,65 ±0,7	12,35 ±0,6
Кверцетин	3,58 ±0,01	3,28 ±0,03	3,44 ±0,02	3,26 ±0,04	3,36 ±0,02	3,29 ±0,03	3,44 ±0,05	3,08 ±0,03	3,05 ±0,01	3,11 ±0,05	3,00 ±0,06
Катехін	277,57 ±5,5	258,25 ±6,3	264,72 ±6,3	249 ±5,8	260,91 ±5,1	255,37 ±5,3	266,47 ±6,1	240,07 ±5,2	235,93 ±5,0	241,50 ±5,1	238,77 ±3,5

В якості референтних препаратів обрано збір «Арфазетин» (ЗАТ «Ліктрави», Україна) та метформін (KRKA, Slovenia; Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Poland). Збір «Арфазетин» був обумовлений тим, що на даний момент на фармацевтичному ринку України це єдиний препарат рослинного походження з протидіабетичною активністю. В склад збору входять пагінці чорниці (20%), лушпинки плодів квасолі звичайної (20%), кореневище з корінням ехінопанаксу високого (заманихи) (15%), плоди шипшини (15%), трава хвощу польового (10%), трава звіробою (10%), квітки ромашки (10%) [98]. Настій збору «Арфазетин» готували згідно інструкції та вводили лабораторним тваринам рекомендовану дозу, перераховану для щурів. Метформін є лікарським препаратом першого вибору, який застосовується при лікуванні ЦД2, діюча речовина – метформіну гідрохлорид [98] та застосовували дозу, ефективність якої для щурів, підтверджена шляхом експерименту [99]. При необхідності в процесі здійснення експерименту деяким групам тварин вводили цистеїн (L-Cysteine, Sigma-Aldrich) та аргінін (L-Arginine, Sigma-Aldrich). Всі субстанції, які були об'єктами дослідження вводили тваринам внутрішньошлунково за допомогою шлункового катетера зі шприц-гільзою.

Дизайн експерименту

Експериментальну частину роботи виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ (посвідчення № 058/15 від 08.12.2015 р.; чинне до 07.12.2019 р.) та кафедри біологічної хімії НФаУ. Етапи експерименту та їх характеристики наведені у таблиці 2.2:

Таблиця 2.2

Характеристика основних етапів експериментальних досліджень

Етап дослідження	Зміст етапу дослідження	Очікувані результати
1й етап	Первинний скринінг гіпоглікемічної активності ПЕ ₅₀ , ПЕ ₉₀ та ПЕ _В на нормоглікемічних тваринах та при навантаженні глюкозою. Вивчення гострої токсичності.	Відбір найбільш активного екстракту для наступної модифікації та вивчення. Визначення найбільш ефективної дози.

2й етап	Скринінг гіпоглікемічної активності та визначення найбільш активних екстрактів, які модифіковані додаванням амінокислот на нормоглікемічних щурах та при навантаженні глюкозою.	Відбір найбільш активних екстрактів, які модифіковані, для подальшого вивчення.
3й етап	Вивчення гіпоглікемічної, антиоксидантної та гіполіпідемічної активності відібраних екстрактів, впливу введення цих екстрактів на функціональний стан печінки та морфогістологічний стан підшлункової залози на тлі експериментальної ІР.	Вивчення механізмів гупоглікемічної дії екстрактів та перспектив їхнього застосування в комплексній терапії та профілактиці ЦД2.

Усі дослідження проведені на 480 білих нелінійних щурах та 30 мишах (20-25 г), які були отримані з розпліднику віварію ЦНДЛ НФаУ (м. Харків). Для проведення дослідження були відібрані самці щурів у віці від 12 тижнів до 6 місяців в залежності від особливостей експерименту, масою від 180 до 240 г.

Умови утримання тварин передбачали кількість тварин у клітці 2-3 голови, розмір клітки 425x265x180 мм. Матеріал клітки пластиковий корпус, металева решітчаста кришка та пластикова кришка. Маркування клітини – номер клітки, номер групи, кількість тварин, стать тварин, лабораторні тварини, дата народження, дата народження. Від досліджень, назва і дози, термін введення препарату, дата початку та закінчення досліду, ПІБ відповідального виконавця. Тварини різних груп розміщуються в різних клітках. Основний раціон гранульовані корма ТУ.У15.7-2123600159-001:2007; джерело води – відстояна водопровідна вода у поїлках (*ad libitum*), якщо умовами експерименту не передбачено інше. Підстилка – тирса листяних порід дерев; температура повітря – 20-24°C; вологість повітря 55±10%; освітлення день/ніч (12:12).

Анестезію тварин забезпечували шляхом внутрішньоочеревинного введення препарату «Тіопента» (пор. для ін'єкцій, виробник – ТОВ «Бровафарма») – тіопентал натрію, у дозі 10 мг/кг.

Експерименти на тваринах проводилися після отримання дозволу Комісії з питань біоетики НФаУ, після вивчення ходу проведення досліджень експертна група зробила висновки, що дослідження відповідають сучасними науковими стандартами та етичним принципам, експерименти виконано з урахуванням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. №3447-IV та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург) від 18.03.1986 р. (Протокол № 1 засідання Комісії з питань біоетики НФаУ від 02.10.2019 р.).

Для первинного скринінгу гіпоглікемічної активності на нормоглікемічних тваринах [2.6] тварин було випадково поділено на групи ($n = 4$): 1 – інтактний контроль (ІК) здорові тварини, яким вводили фізіологічний розчин; 2-4 – тваринам вводили ПЕ_В (ПЕвод) у дозах 50, 100, 500 мг/кг; 5-7 – тваринам вводили ПЕ₅₀ (ПЕ50) 50, 100, 500 мг/кг; 8-10 – тваринам вводили ПЕ₉₀ (ПЕ90) 50, 100, 500 мг/кг; 11 – тваринам вводили відвар збору «Арфазетин» (Арф) в дозі 18 мл/кг. Досліджувані екстракти та препарати порівняння вводили тваринам після голодування протягом ночі (12 годин). Концентрацію глюкози в крові визначали через 0, 2, 4, 6 та 8 годин після введення екстрактів.

Для проведення *орального тесту на толерантність до глюкози* (ОТТГ) у здорових щурів [100] тварини були рандомізовані на групи ($n = 6$): 1 – інтактний контроль (ІК) здорові тварини, яким вводили фізіологічний розчин; 2 – тварини (Контр), яким вводили розчин глюкози в дозі 3 г/кг маси тіла *per os* (навантаження глюкозою, для інших груп тварин через 30 хв після введення екстрактів); 3 – тварини після навантаження глюкозою та введення ПЕ_В в дозі 100 мг/кг (ПЕвод); 4 – тварини після навантаження глюкозою та введення ПЕ₅₀ в дозі 100 мг/кг (ПЕ50); 5 – тварини після навантаження глюкозою та введення ПЕ₉₀ в дозі 100 мг/кг (ПЕ90); 6 – тварини після навантаження глюкозою, яким введено відвар збору «Арфазетин» (Арф) в дозі 18 мл/кг маси тіла; 7 – тваринам після навантаження глюкозою вводили метформін (Мет) в дозі 100 мг/кг.

Концентрацію глюкози в крові визначали через 0, 15, 30, 60 та 120 хвилин після навантаження глюкозою.

Первинний фармакологічний скринінг нових гіпоглікемічних властивостей поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням амінокислот проводили на інтактних тваринах [2.6]. Тварини були розділені на групи ($n = 4$), за 16 годин до початку експерименту тварин позбавляли їжі, але зберігали вільний доступ до води: 1 – інтактний контроль (ІК) – здорові тварини, яким вводили фізіологічний розчин; 2 – тварини, яким вводили PE_{50} у дозі 100 мг/кг (PE_{50}); 3-12 – тварини, яким вводили поліфенольні екстракти з додаванням амінокислот у дозі 100 мг/кг. Відповідно до номерів груп з додаванням: 3 – цистеїну (ПЕцис), 4 – фенілаланіну (ПЕфен), 5 – валіну (ПЕвал), 6 – гліцину (ПЕгли), 7 – аланіну (ПЕала), 8 – лейцину (ПЕлей), 9 – гістидину (ПЕгіс), 10 – лізину (ПЕліз), 11 – аргініну (ПЕарг), 12 – глютамінової кислоти (ПЕглу); 13 – тварини, яким вводили відвар збору «Арфазетин» у дозі 18 мл/кг. Концентрація глюкози в крові через 0, 2, 4, 6 та 8 годин після введення екстрактів.

Для дослідження *гіпоглікемічної активності* за допомогою *ОТТГ* використовували екстракти PE_{50} , ПЕцис, РЕарг, які показали найвищу активність у попередньому тесті. Тварин було розподілене на групи ($n = 6$): 1 – інтактний контроль (Інтакт) – здорові тварини, яким вводили фізіологічний розчин; 2 – тварини (Контроль), яким вводили розчин глюкози в дозі 3 г/кг маси тіла per os (навантаження глюкозою, для іншої групи тварин через 30 хв після введення препарату); 3 – тварини після навантаження глюкозою та введення PE_{50} (ПЕ); 4 – тварини після навантаження глюкозою та введення ПЕцис (ПЕ+цистеїн); 5 – тварини після навантаження глюкозою та введення ПЕарг (ПЕ+аргінін); 6 – тварини після навантаження глюкозою та введення ПЕглу (ПЕ+глютамат); 7 – тварини після навантаження глюкозою та введення відвару збору «Арфазетин» у дозі 18 мл/кг (Арфазетін); 8 – тварини після навантаження глюкозою та введення метформіну у дозі 100 мг/кг. Концентрацію глюкози в крові визначали через 0, 15, 30, 60, 90 та 120 хвилин після завантаження глюкози.

У пошуках ефективних методів профілактики та лікування моделювання захворювань має дуже важливе значення, як для дослідження патогенезу, так і для пошуку потенційно корисних ліків. Експериментальні дослідження цукрового діабету на тваринних моделях є особливо важливою технікою в дослідженні ЦД2 [101]. Вибір моделей, які були використані в роботі, обумовлений багаточисленними науковими свідченнями, що розвиток ІР є не лише основною ланкою патогенезу ЦД 2, але й основною причиною патологічних та метаболічних змін супроводжуючих хворобу. Саме корекція ІР – це ключ до запобігання ЦД2 для підвищення чутливості до інсуліну та покращення ІР. Для різнобічного вивчення дії субстанцій, які досліджувалися, були використані моделі, які за своїм механізмом імітують причини розвитку ЦД2 людини. [102]

Таким чином, для *моделювання ІР* були вибрані дві експериментальні моделі, які мають багаточисленні експериментальні свідчення ефективності та розрізняються за принципом, а саме ІР, яка індукована дексаметазоном та ІР, яка індукована високим вмістом фруктози в дієті. Однак, в наших експериментах застосовували модифікації як дексаметазон-індукованої моделі ІР, так і ІР, яка викликається високофруктозною дієтою, які розроблені співробітниками кафедри біологічної хімії НФаУ.

Глюкокортикоїд-індукована ІР викликала тривалими внутрішньочеревинними ін'єкціями низьких доз дексаметазону. ІР розвивалася під дією щоденних внутрішньочеревних ін'єкцій дексаметазону (15 мкг/кг/добу) протягом 7 тижнів (Декс) [103].

Дексаметазон-індукована модель ІР. Розподіл тварин по групах був проведений наступним чином: 1 – інтактні тварини (ІК); 2 – тварини з контрольною патологією, яким щодня внутрішньочеревно вводили розчин дексаметазону в дозі 15 мкг/кг маси тіла протягом 7 тижнів (Декс); 3 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група Декс), та яким, починаючи з 5-го тижня досліду, протягом 2 тижнів вводили PE_{50} у дозі 100 мг/кг маси тіла (Декс_ПЕ); 4 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група

Декс), та яким починаючи з 5-го тижня досліду вводили ПЕцис у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Декс_ПЕцис); 5 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група Декс), та яким, починаючи з 5-го тижня досліду вводили ПЕарг у дозі 100 мг/кг (Декс_ПЕарг); 6 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група Декс), та яким, починаючи з 5-го тижня досліду вводили цистеїн у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Декс_цис); 7 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група Декс), та яким, починаючи з 5-го тижня досліду вводили аргінін у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Декс_арг); 8 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група Декс), та яким починаючи з 5-го тижня досліду вводили метформін у дозі 100 мг/кг (Декс_мет); 9 – тварини, яким здійснювали ін'єкції дексаметазону (див. група Декс), та яким, починаючи з 5-го тижня досліду, протягом 2 тижнів вводили відвар збору «Арфазетин» у дозі 18 мл/кг маси тіла (Декс_арф).

Для індукції ІР дієтою тваринам воду замінювали на 20% водний розчин фруктози (у вільному доступі) протягом 7 тижнів – високофруктозна дієта (ВФД) [104, 105].

Високофруктозна модель ІР. Розподіл тварин по групах був проведений наступним чином: 1 – інтактні тварини (ІК); 2 – тварини з контрольною патологією, які отримували високофруктозну дієту протягом 7 тижнів (ВФД); 3 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким, починаючи з 5-го тижня досліду, протягом 2 тижнів вводили РЕ₅₀ у дозі 100 мг/кг маси тіла (ВФД_ПЕ); 4 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким починаючи з 5-го тижня досліду ПЕцис у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (ВФД_ПЕцис); 5 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким, починаючи з 5-го тижня досліду вводили ПЕарг у дозі 100 мг/кг (Декс_ПЕарг); 6 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким, починаючи з 5-го тижня досліду вводили цистеїн у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (ВФД_цис); 7 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким, починаючи з 5-го тижня досліду вводили аргінін у дозі 100 мг/кг

маси тіла протягом 2 тижнів (ВФД_арг); 8 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким починаючи з 5-го тижня досліду вводили метформін у дозі 100 мг/кг (ВФД_мет); 9 – тварини, які отримували високофруктозну дієту, та яким, починаючи з 5-го тижня досліду, протягом 2 тижнів вводили відвар збору «Арфазетин» у дозі 18 мл/кг маси тіла (ВФД_арф).

У відповідний запланований останній день експерименту щурів усіх груп, які голодували протягом 12 годин, виводили з експерименту шляхом декапітації та відбирали зразки крові для отримання сироватки крові. Печінку та підшлункову залозу перфузували та промивали в крижаному фізіологічному розчині отримували 10% гомогенати (10 мМ трис-НСl-буфер рН 7,4). Для отримання гомогенатів використовували гомогенізатор Поттера з охолодженою скляною пробіркою.

При проведенні скринінгових досліджень гіпоглікемічної активності та ОТТГ при необхідності визначати *концентрацію глюкози в крові* у тварин декілька разів через певні проміжки часу, проби крові відбирали шляхом пункції гінгівальної вени [106]. Концентрацію глюкози в крові, в цьому разі, визначали за допомогою глюкометра «One Touch Select» (LifeScan, США). Для визначення концентрації глюкози в сироватці крові використовували набір реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна). Рівень глюкози в крові натще та концентрацію імунореактивного інсуліну (ІРІ) визначали за допомогою комерційно доступних наборів (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна та «DRG», Німеччина, відповідно). А потім розраховували індекс оцінки моделі гомеостазу (НОМА) за допомогою калькулятора веб-сайту Oxford (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>).

Для оцінки функціонального стану печінки в сироватці крові вимірювали активність ферментів уніфікованими методами: аланінамінотрансферази (АЛАТ) кінетичним методом, аспартатамінотрансферази (АСАТ) кінетичним методом, лужної фосфатази (ЛФ) кінетичним методом з АМП-буфером, γ -глутамілтранспептидази (ГГТП) кінетичним методом. Для визначення

активності перелічених ферментів використовували набори реактивів виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна.

З метою оцінки змін ліпідного спектру в сироватці крові тварин досліджували показники ліпідного обміну загальноприйнятими уніфікованими методами: загальні ліпіди (ЗЛ) визначали методом з фосфованіліновим реактивом, тригліцериди (ТГ) ензиматичним колориметричним методом, загальний холестерол (Хс) ензиматичним методом, холестерол ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ-Хс) прямим методом «LDL-Ф», холестерол ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ-Хс) прямим методом «HDL-Ф», для чого використовували комерційні набори виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Інтенсифікацію вільнорадикальних процесів за умов експериментальної ІР та її корекції поліфенольними екстрактами ПЕарг та ПЕцис оцінювали за кількісним вмістом в гомогенаті печінки та підшлункової залози активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) та дієнових кон'югантів (ДК) з використанням загальновизнаних методик. Так, концентрацію ТБК-АП вимірювали відповідно до методу Buege J.A., Aust S.D. [107] Принцип методу полягає в тому, що в кислому середовищі при високій температурі малоновий диальдегід реагує з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворюючи забарвлений комплекс червоного кольору з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм. Значення виражали в нмоль/мг білка. Для визначення вмісту ДК використовували метод Peg R.G. [108] Гідропероксиди з поліненасичених кислот утворюють ДК, які кількісно визначали за допомогою УФ - спектрофотометричного вимірювання при довжині хвилі 234 нм. Значення виражали в нмоль/мг білка.

У кожному зразку гомогенату тканин визначали показники, що характеризують стан системи антиоксидантного захисту, зокрема активність супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), глутатіонпероксидази (ГП) та вмістом відновленого глутатіону (ГлВ). Активність СОД в гомогенаті тканин визначали у відповідності до методу McCord and Fridovich [109] за ступенем

інгібування реакції відновлення феррицитохрома-С супераніонрадикалом, який генерувався ксанти-ксантиноксидазної системою. За одиницю приймалася активність, яка необхідна для інгібування реакції на 50%. Активність СОД виражали в ОД/мг білка. Активність каталази визначали по зменшенню H_2O_2 [110]. В ультрафіолетовому діапазоні H_2O_2 показує постійне збільшення поглинання зі зменшенням довжини хвилі. Розкладання H_2O_2 може супроводжуватися безпосередньо зменшенням екстинкції на 240 нм. Активність КАТ виражали в мкмоль розкладеної H_2O_2 / хв/ мг білка або ОД/мг білка.

Глутатіонпероксидазу (ГП) визначали за методом, описаним Hafemann et al. [111], використовуючи розкладання перекису водню у присутності ГлВ, тим самим виснажуючи його. Залишок GSH вимірювали за допомогою 5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойна кислота) (ДТНБ, реактив Елмана), який дає кольоровий комплекс. Активність ГП виражали у мкмоль GSH/хв $\times$ мг білка або ОД/мг білка.

Вміст відновленого глутатіону (ГлВ) визначали згідно методу Moron MS et al. [112] за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з реактивом Елмана при довжині хвилі 412 нм. Виражали в нмоль/ мг тканини.

Кількість білку у гомогенатах тканин визначали за методом J.Y Lowry в модифікації G.L. Miller [113]. при використанні калібрувального розчину білка як стандарту (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна). Принцип методу полягає в утворенні кольорових продуктів взаємодії ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки протеїну.

У щурів, при вивченні впливу ПЕарг та ПЕцис на моделях експериментальної ІР (розподіл експериментальних груп дивись вище), були проведені *гістологічні дослідження підшлункової залози*. Для цих досліджень після евтаназії негайно вилучали тіло та хвостову частину підшлункової залози, які розміщені у товщі шлунково-селезінкової зв'язки щурів. Отриманий матеріал фіксували у 10% розчині формаліну, дегідратували у спиртах зростаючої

концентрації, заливали у целоїдин-парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином [114, 115].

Отримані гістологічні препарати вивчали та фотографували при збільшенні $\times 100$, $\times 200$, $\times 250$ і $\times 400$. Перегляд мікропрепаратів проводили під світловим мікроскопом Granum, фотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровою відеокамерою Granum DCM 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Tour View. В усіх досліджуваних групах піддослідних тварин на зрізах підшлункової залози визначали оптичну щільність – загальну кількість панкреатичних островців (ПО) у мікропрепараті, островцевий профіль – розподіл панкреатичних островців за вмістом бета-клітин та функціональний індекс (ФІ) – відношення бета-клітин до альфа-клітин. За показником островцевого профілю проводили розподіл островків на: дрібні (до 20 бета-клітин у островку, 300-500 мкм), середні (21-60 β -клітин у островку, 600-1200 мкм) та великі (>61 β -клітин у островку, 1400-2500 мкм), визначали відсоткову частку кожної категорії ПО [116].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою пакету програм «Statistica 6» та MS Excel 2010 і представляли у вигляді порівняльних таблиць із результатами різних груп, відмінності вважали статистично значущими за $p < 0,05$ [117].

РОЗДІЛ 3

СКРИНІНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ СУХИХ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ

В першому розділі ми детально обговорили провідні патогенетичні механізми, що обумовлюють розвиток ІР та, відповідно, ЦД2. Узагальнені механізми гіпоглікемічної дії окремих компонентів або комплексів сполук рослинного походження, які на даний час використовуються як антигіпеглікемічні засоби в комплексній терапії ЦД2.

Метою першого етапу досліджень став відбір серед досліджуваних екстрактів з мучниці звичайної листя, без та з додаванням амінокислот, субстанцій з найвиразнішою гіпоглікемічною активністю та властивостями нетоксичних для поглибленого вивчення.

3.1. Вивчення гіпоглікемічної активності сухих екстрактів мучниці звичайної листя на нормоглікемічних щурах

Отже, перший етап експерименту був проведений для того, щоб за допомогою первинного фармакологічного скринінгу провести відбір з нових розроблених поліфенольних екстрактів, а саме ПЕ_В, ПЕ₅₀ та ПЕ₉₀, такий, який має найбільш виразну гіпоглікемічну активність та відповідну найбільш ефективну дозу. Ці первинні дослідження згідно загальноприйнятим методам були проведені на нормоглікемічних тваринах без та при навантаженні глюкозою використовуючи ОТТГ [100].

Нами встановлено, що більш виражений гіпоглікемічний ефект настає через 6 годин після введення поліфенольних екстрактів (табл. 3.1.). Так, гіпоглікемічний ефект ПЕ_В був незначним протягом усього часу спостереження. Досить виразне зниження рівня глюкози крові визначено для РЕ₅₀ у дозах 50 мг/кг (8,1 % від вихідного рівня), 100 мг/кг (14,4 % від вихідного рівня) та 500

мг/кг (7,2 % від вихідного рівня). При введенні PE₉₀ максимальне зниження у крові вмісту глюкози спостерігалось також через 6 год від введення екстракту, але тільки в дозі 100 мг/кг [118].

Таблиця 3.1.

Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів мучниці звичайної листя на нормоглікемічних щурах без навантаження глюкозою

Група	Субстанція	Доза (на кг маси тіла)	Глюкоза крові, ммоль/л				
			0	2 год	4 год	6 год	8 год
1	NaCl, 0,9 %	1 мг	3,97 ± 0,23	3,92 ± 0,22	4,04 ± 0,26	3,83 ± 0,18	3,85 ± 0,09
2	PE _B	50	3,91 ± 0,18	3,96 ± 0,23	3,87 ± 0,22	3,91 ± 0,21	4,02 ± 0,14
3		100	4,04 ± 0,13	3,95 ± 0,19	4,01 ± 0,19	3,89 ± 0,19	3,87 ± 0,15
4		500	3,96 ± 0,19	3,89 ± 0,21	3,79 ± 0,14	3,87 ± 0,17	3,98 ± 0,23
5	PE ₅₀	50	4,05 ± 0,17	3,93 ± 0,17	3,81 ± 0,23	3,74 ± 0,24*	3,90 ± 0,21
6		100	4,01 ± 0,11	3,88 ± 0,24	3,61 ± 0,22*	3,43 ± 0,17*	3,72 ± 0,24
7		500	3,99 ± 0,24	3,94 ± 0,16	3,78 ± 0,19	3,70 ± 0,21*	3,81 ± 0,19
8	PE ₉₀	50	3,93 ± 0,15	3,84 ± 0,21	3,72 ± 0,24	3,65 ± 0,19	3,84 ± 0,18
9		100	3,89 ± 0,10	3,72 ± 0,18	3,67 ± 0,18	3,41 ± 0,14*	3,69 ± 0,21
10		500	4,06 ± 0,16	3,94 ± 0,22	3,71 ± 0,21	3,77 ± 0,09	3,93 ± 0,23
11	Арф	18 мл	4,02 ± 0,22	3,63 ± 0,21	3,42 ± 0,24*	3,33 ± 0,21*	3,82 ± 0,14

Примітки:

* – p<0,05 – достовірно порівняно з групою 1 (інтактні тварини)

Таким чином, при використанні тварин з нормальним вуглеводним гомеостазом ми спостерігали, що швидкість зниження глюкози була більш помітною при введенні PE₅₀ у дозі 100 мг/кг, не поступаючись за рівнем активності препарату порівняння збору «Арфазетин».

Далі ми вивчали потенційну гіпоглікемічну активність за допомогою ОТТГ. При вивченні досліджуваних екстрактів, які вводили у дозах 50, 100 та 250 мг/кг, було зазначено, що виявлена гіпоглікемічна активність, суттєво залежала від екстрактора і використаної дози (табл. 3.2.). Таким, який виявив найбільшу гіпоглікемічну активність є сухий екстракт мучниці звичайної листя одержаний 50% етанолом у дозі 100 мг/кг.

Таблиця 3.2.

Результати ОТТГ у щурів з нормальним вуглеводним гомеостазом при введенні ПЕ₅₀ та ПУ₉₀ у дозах 50, 100 та 250 мг/кг

Групи/ Час	ІК	Контр	ПЕ ₅₀ /50	ПЕ ₅₀ /100	ПЕ ₅₀ /250	ПЕ ₉₀ /50	ПЕ ₉₀ /100	ПЕ ₉₀ /250
0	3,96± 0,25	4,05± 0,19	3,98± 0,19	4,02± 0,25	4,05± 0,18	3,95± 0,35	4,05± 0,28	3,95± 0,19
15 хв	3,91± 0,31	4,67± 0,21	4,65± 0,24	4,43± 0,19	4,40± 0,25	4,81± 0,22	4,71± 0,33	4,75± 0,22
30 хв	3,82± 0,21	5,74± 0,27	5,93± 0,37	5,61± 0,34	5,65± 0,29	5,85± 0,37	5,57± 0,35	5,54± 0,27
60 хв	3,91± 0,22	7,18± 0,35	6,03± 0,42	5,87± 0,37*	5,80± 0,34*	6,05± 0,44	5,91± 0,34*	5,96± 0,31
120 хв	3,87± 0,19	4,67± 0,24	5,55± 0,33	4,43± 0,28	4,51± 0,27	5,42± 0,29	4,76± 0,26	4,83± 0,31

Примітки:

* – $p < 0,05$ – порівняно з групою ІК

На рис. 3.1. зображено результат ОТТГ у щурів з нормальним вуглеводним гомеостазом після перорального введення екстрактів.

Результати ОТТГ у щурів з нормальним вуглеводним гомеостазом представлені на рис. 3.1. Вихідні рівні глюкози крові не відрізнялися між групами, однак, після навантаження глюкозою зміни глікемічних кривих відбувалися наступним чином: спочатку рівень глюкози поступово піднімався, максимальний рівень підйому спостерігали через 60 хв, потім рівень глюкози починав поступово знижуватись, проте до вихідних цифр доходив не в усіх групах тварин. Виявилося, що навантаження глюкозою викликало гіперглікемію на 60,3 % через 60 хв. (контрольна група).

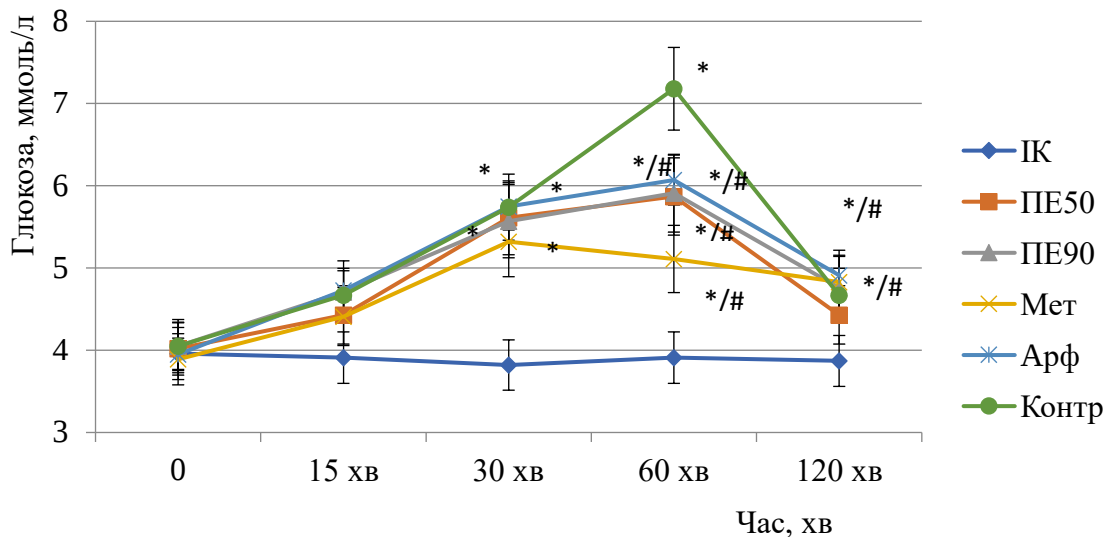


Рис. 3.1. Вплив екстрактів мучниці звичайної листя (доза 100 мг/кг) на рівень глюкози в крові (ммоль/л) у нормоглікемічних щурів при навантаженні глюкозою

Примітки:

* – $p < 0,05$ – порівняно з групою ІК;

– $p < 0,05$ – порівняно з контрольною групою.

Введення ПЕв не виказало значного ефекту на динаміку глікемії. В той же час, введення ПЕ₅₀ викликало достовірне зниження рівня глюкози в крові через 30 хвилин на 18,7%, через 60 хв на 26,8% порівняно з контрольною групою. Застосування ПЕ₉₀ знижувало рівень глюкози у тварин на 17,6% через 60 хв. Порівнюючи ефект референс-препаратів щодо зниження рівню глюкози через 60 хв тесту з тваринами контрольної групи, треба відмітити, що вплив метформіну незначно перевищував ефект ПЕ₅₀ (28,8%), однак, збір «Арфазентин» виявив меншу активність (18,2%).

Отже, у проведених експериментах було встановлено, що розроблений оригінальний склад ПЕ₅₀ на тлі вуглеводного навантаження підвищує у щурів толерантність до вуглеводів та є найбільш перспективним для подальшого вивчення.

3.2. Вивчення гіпоглікемічної активності сухих екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот на нормоглікемічних щурах

Ще 20 років тому почали з'являтися експериментальні та клінічні свідчення, що резистентність до інсуліну впливає на концентрацію амінокислот в плазмі крові та, також, дослідження, що дієта збагачена білками може корегувати порушення метаболізму глюкози [119]. Вивчалися, як вплив від введення суміші амінокислот, так і ефекти, які можуть бути викликані введенням окремих амінокислот. Так, наприклад, намагання зрозуміти механізми впливу амінокислот на метаболізм, показали, що сприятливий вплив суміші амінокислот на засвоєння глюкози скелетними м'язами на тлі постпрандіальної глікемії і підвищенні рівня інсуліну, обумовлен стимулюванням фосфорилування одного з сигнальних білків інсуліну, який пов'язаний з транслокацією GLUT4, субстратом Akt 160 кДа (Akt substrate of 160 kDa, AS160) та ізоформи самого інсулін-чутливого транспортера глюкози (glucose transporter type 4, GLUT4), пов'язаного з плазматичною мембраною [120]. В доступних для аналізу даних практично не існують досліджень щодо поєднання амінокислот та засобів, які містять сполуки рослинного походження для лікування або корекції інсулінорезистентності, ЦД2, метаболічного синдрому. З одного боку, літературні дані надали нам ідею модифікувати субстанції рослинного походження, зокрема екстракти з мучниці звичайної листя, додаванням амінокислот, а з іншого боку дослідження впливу амінокислот є поодинокі на тлі потоку експериментальних робіт, присвячених пошуку шляхів корекції метаболічних порушень при ЦД2, тому дослідження комплексних субстанцій рослинного походження з амінокислотами мають не тільки практичне значення [121].

Результати другого етапу експерименту з вивчення гіпоглікемічної активності сухих екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот на тваринах з нормальним вуглеводним гомеостазом, показано в табл. 3.3. На цьому етапі як препарат порівняння використовували фітозбір «Арфазетин» у

вигляді настою. Враховуючи те, що тварини були здорові та не зазнали навантаження глюкозою, зміни в рівні глюкози в крові більшою мірою були недостовірні, але мали тенденцію до зниження. Лише через 4 години та 6 годин після введення поліфенольних екстрактів з додаванням цистеїну, аргініну та глутамінової кислоти, а також збору «Арфазетин» було зафіксовано достовірне зниження концентрації глюкози порівняно з інтактними тваринами, але вже до 8-ої години наставала нормоглікемія. Проте, зрозуміло, що саме ОТТГ надає розуміння про вплив досліджуваних субстанцій на толерантність до глюкози, що відображається на динаміці змін концентрації глюкози в крові після її вживання натще.

Таблиця 3.3.

Вплив введення екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот на рівень глюкози в крові нормоглікемічних щурів без навантаження глюкозою

Групи тварин	Концентрація глюкози в крові, ммоль/л через відповідний проміжок часу (години)				
	0	2	4	6	8
ІК	3,87±0,17	3,88±0,24	3,93±0,23	3,86±0,13	3,85±0,11
ПЕ ₅₀	4,04±0,14	3,81±0,21	3,54±0,19	3,66±0,17	3,91±0,24
ПЕліз	4,02±0,21	4,04±0,19	3,08±0,15	4,01±0,19	3,98±0,24
ПЕфен	3,87±0,15	3,95±0,11	3,88±0,21	3,74±0,13	3,79±0,21
ПЕвал	3,96±0,17	3,91±0,13	3,95±0,14	3,93±0,24	3,92±0,19
ПЕглі	3,94±0,18	3,89±0,17	3,69±0,18	3,51±0,21*	3,74±0,15
ПЕала	4,01±0,20	3,97±0,18	4,04±0,19	4,01±0,24	3,87±0,24
ПЕлей	3,87±0,15	3,91±0,14	3,83±0,15	3,85±0,11	3,73±0,17
ПЕгіс	3,93±0,17	3,81±0,24	3,67±0,23*	3,79±0,15	3,85±0,16
ПЕцис	3,95±0,15	3,71±0,19	3,42±0,15*	3,51±0,19*	3,88±0,13
ПЕарг	4,01±0,17	3,73±0,13	3,47±0,19*	3,61±0,18*	3,87±0,19
ПЕглу	4,03±0,11	3,87±0,19	3,55±0,17*	3,74±0,19	3,94±0,21
Арф	3,97±0,17	3,61±0,18	3,35±0,14*	3,42±0,14*	3,79±0,18

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з групою ІК

ОТТГ є специфічним для виявлення чутливості тканин до глюкози, оскільки може продемонструвати швидкість утилізації глюкози після її всмоктування. Вважається, що динаміка зниження рівня глюкози після

постпрандіальної гіперглікемії, відображає толерантність до глюкози, а розрахунок AUC може бути інформативним показником саме такого коливання глюкози [122]. Результати тесту на толерантність до глюкози представлені на рис. 3.2. у вигляді графіку, де відображені результати ОТТГ у тварин інтактної та контрольної груп, при введенні препаратів порівняння та, звісно, ПЕ₅₀ та ПЕ₅₀ з додаванням глютамінової кислоти, аргініну та цистеїну. Вміст глюкози натще, як у інтактних щурів, так і у інших здорових тварин до початку експерименту був в межах фізіологічної норми для даного виду лабораторних тварин.

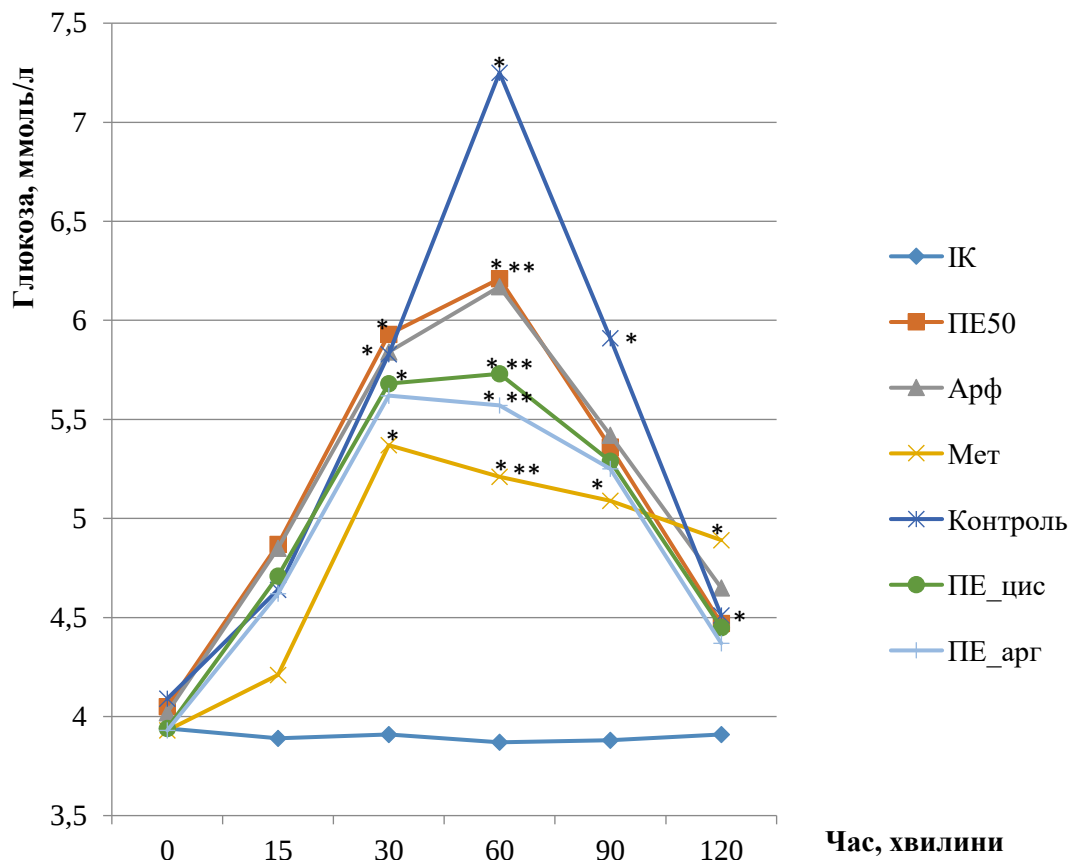


Рис. 3.2. Результати ОТТГ при введенні деяких екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот.

Примітки:

* – $p \leq 0,05$ порівняно з групою ІК;

– $p \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Як наочно ми можемо побачити, рівень глюкози у кожній контрольній точці часу достовірно вище за період після навантаження глюкозою у

контрольній групі порівняно з інтактними тваринами, вже через 30 хвилин після навантаження рівень глюкози зріс на 32,9%, а через 60 хвилин на 46,6% ($7,25 \pm 0,24$ ммоль/л). Введення ПЕ₅₀ знизило концентрацію глюкози в крові через 60 хвилин на 14,3% порівняно з контрольною групою та становив $6,21 \pm 0,56$ ммоль/л. В той же час, додавання амінокислот посилює цей ефект. Так, в групі тварин ПЕарг рівень глюкози знизився через годину на 16%, в групі тварин ПЕцис на 15,2 %.

Показники концентрації глюкози у контрольних точках часу в групах тварин, яким вводили ПЕ₅₀ та ПЕглу не мали суттєвої різниці (рис. 3.2.), через 60 та 90 хвилин зниження рівня глюкози було достовірним по відношенню до контрольної групи. У груп щурів, яким ввели ПЕарг та ПЕцис рівень глюкози в крові був більше знижений порівняно з названими групами. Треба додати, що цей вплив був не таким ефективним, як при введенні референтного препарату метформіну, але, в той же час, перевищували вплив препарату порівняння – збору «Арфазетин».

Вплив сухих екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот на толерантність до глюкози при проведенні ОТТГ оцінений також за допомогою розрахунку AUC під кривою «концентрація глюкози – час» (рис. 3.3.). Результати продемонстрували, що розраховані значення AUC для динаміки змін рівня глюкози в крові у контрольній групі тварин ($710,9 \pm 17,56$ ммоль/л*хв) значно перевищували такий показник у тварин ІК групи ($467,55 \pm 13,14$ ммоль/л*хв). Введення як препаратів порівняння, так і екстрактів з додаванням амінокислот, показало зниження AUC відносно контрольної групи з різним ступенем співвідношення. Зокрема, можна відмітити достовірні та найвиразніші зміни: зниження площі під кривою протягом 120 хвилин спостереження, порівняно з контрольною групою з навантаженням глюкозою для груп ПЕ₅₀ ($652,8 \pm 21,32$ ммоль/л*хв), ПЕарг ($617,4 \pm 18,34$ ммоль/л*хв) та ПЕцис ($621,3 \pm 19,61$ ммоль/л*хв).

Крім того, введення метформіну призводило до найбільшого зниження площі під кривою, при цьому, AUC для іншого препарату порівняння – збору

«Арфазетин» була більше, чим при введенні ПЕ₅₀ та ПЕарг та ПЕцис. В проведених експериментах було встановлено, що розроблені екстракти, на тлі вуглеводного навантаження, знижують постпрандіальний рівень глюкози в крові у щурів порівняно з контрольними тваринами. З огляду на те, що глікемічна крива після перорального навантаження глюкозою та розрахунок площі під кривою здатні певною мірою відобразити процеси утилізації глюкози в організмі експериментальних тварин, можна припустити, що в умовах вуглеводного навантаження саме під дією сухого екстракту мучниці звичайної листя, інтенсивність поглинання глюкози тканинами зростає.

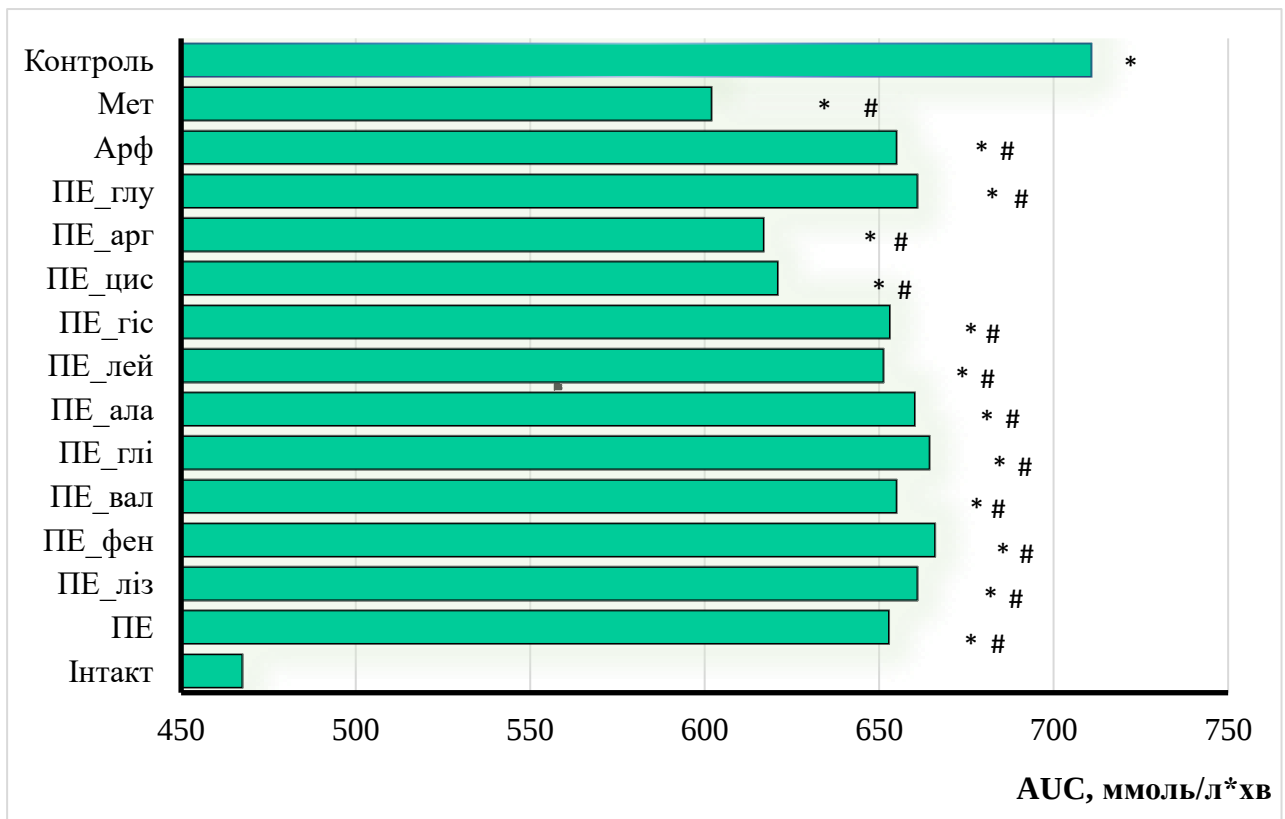


Рис. 3.3. Площа AUC під кривою «концентрація глюкози – час» при проведенні ОТТГ на тлі введення сухих екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот

Примітки:

*а – $p \leq 0,05$ порівняно з ІК групою;

– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

В той же час, експериментально було встановлено, що додавання певних амінокислот, зокрема аргініну та цистеїну до ПЕ₅₀ підвищували у тварин толерантність до вуглеводів.

Виходячи з того, що найбільшу гіпоглікемічну активність виявили екстракти модифіковані аргініном та цистеїном, доцільно звернути увагу на підтверджену та імовірну роль цих амінокислот метаболізмі ссавців. Загально відомо, що аргінін це напівзамінна амінокислота, яка бере участь у синтезі білків, креатину, поліамінів, агматину, сечовини, метаболізмі проліну та глутамату в організмі. Останнім часом аргінін привернув інтерес як попередник оксиду азоту (NO), біологічна роль якого як вторинного посередника, призвела до широкого використання аргініну як додаткової терапії при різних станах з порушеннями NO. Так, добавки аргініну мають ефективну дію, яка допомагає поліпшити чутливість до інсуліну та функцію ендотелію, імовірно за допомогою вироблення NO. NO стимулює транспорт глюкози в скелетних м'язах із збільшенням рівня GLUT4 на її поверхні, що призводить до поліпшення резистентності до інсуліну [123]. Є відомості, що аргінін і глюкагоноподібний пептид-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) мають біологічний зв'язок, так у генетично модифікованих мишей без рецептора GLP-1 аргінін не впливав на метаболізм глюкози [124]. Також було показано, що при вивченні здатності амінокислот стимулювати вивільнення GLP-1 аргінін виявився одною з таких кислот [125].

Цистеїн є протеїногенною амінокислотою але, як і аргінін, виконує безліч функцій завдяки хімічним властивостям відновленої сірки, він є єдиною амінокислотою, яка містить реакційноздатну сульфгідрильну групу. Наприклад, клітини використовують цистеїн для відновлення антиоксидантного трипептиду глутатіону. Це обумовило використання цистеїну для корекції різних метаболічних порушень. Так, було показано, що добавки цистеїну можуть знижувати гіперлікемію та маркери судинного запалення при ЦД2, мабуть, запобігаючи активації ядерного фактору каппа-підсилювача легких ланцюгів активованих β-клітин (NF-κappaB) на моделі діабетичних тварин та позитивно

регулюють вплив інсуліну на метаболізм глутатіону та глюкози в адипоцитах. Це свідчить про те, що такі добавки можуть підвищити чутливість до інсуліну і можуть використовуватися як допоміжна терапія ЦД2 [126, 127].

Для більш поглибленого дослідження гіпоглікемічної активності та можливих механізмів дії досліджуваних екстрактів, поряд з використанням ОТТГ на тваринах з нормальним вуглеводним гомеостазом, необхідно проводити обов'язкове вивчення їхньої дії на тваринах з модельною патологією.

3.3. Дослідження гострої токсичності сухих екстрактів мучниці звичайної листя

Безпечність лікарських засобів є однією з найважливіших умов їхнього застосування в медичній практиці. Тому експериментальна фармакологія спрямована на створення засобів, що забезпечують виразний терапевтичний ефект і одночасно виявляють мінімальний негативний вплив на організм. Визначення параметрів гострої токсичності нових субстанцій складає обов'язковий етап досліджень їхніх фармакологічних властивостей.

Дослідження гострої токсичності ПЕ₅₀ з листя мучниці звичайної проводили на щурах шляхом його внутрішлункового однократного введення у два етапи [128]. Відповідно до протоколу дослідження здорові тварини були випадково поділені на групи з 3х тварин. Під час першої стадії 3 групам тварин вводили відповідно 100, 600 і 1000 мг/кг ПЕ₅₀, ПЕ₉₀ та ПЕ_В внутрішньошлунково і спостерігали протягом перших 4 годин і 24 годин для виявлення ознак токсичності та смертності. Для другого етапу були обрані дози 2000, 3000 і 5000 мг/кг і 3 групи щурів після одноразового внутрішньошлункового введення спостерігали за ознаками токсичності та смертністю протягом 72 годин. Таким чином, найвища доза, яку вводили становила 5000 мг/кг. Аналіз отриманих даних показав, що при введенні даних доз поліфенольних екстрактів загибелі тварин не спостерігалось. Об'єм рідини, що вводився тваринам, не перевищував допустимі, які визначені методичними вказівками, тому подальше збільшення

дози було неможливим. Хоча визначити середньолетальні дози досліджуваних поліфенольних екстрактів не вдалося, нами було встановлено, вони перевищують 5000 мг/кг, що дозволяє віднести ПЕ₅₀, ПЕ₉₀ та ПЕв до класу V – «практично нетоксичні речовини» при внутрішньошлунковому введенні [100].

Далі було проведено вивчення гострої токсичності ПЕ₅₀ з мучниці звичайної листя на мишах обох статей при внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревному введенні. Для цього тварини були розподілені на 6 груп: внутрішньошлунково в дозах 1000; 3000; 5000 мг/кг, іншим трьом – внутрішньоочеревино в дозах 300; 700; 1000 мг/кг [129]. Реєстрували летальність протягом 2 тижнів. Результати наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4.

Вивчення гострої токсичності ПЕ₅₀ на мишах при однократному внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревинному введенні

Шлях введення	Доза, мг/кг	Кількість тварин в групі	Ефект, який спостерігався: летальність /кількість тварин
внутрішньошлунково	1000	5	0/5
	3000	5	0/5
	5000	5	0/5
внутрішньоочеревинно	300	5	0/5
	700	5	0/5
	1000	5	0/5

Як свідчать дані, що наведені в таблиці 3.1.1 в жодній групі протягом двох тижнів експерименту загибелі тварин не відмічене, у зв'язку з чим установити ЛД₅₀ неможливо. При спостереженні також оцінювали, загальний стан тварин, стан шкіри, слизових оболонок, температуру тіла, зміни положення тіла, судоми, процеси дефекації та сечовиділення. Треба відмітити, що протягом всього періоду спостереження, не було зафіксовано порушень фізіологічного стану

тварин в групах, яким вводилися досліджувані екстракти. Взагалі, частота дихальних рухів, ритм серцевих скорочень, реакції на больові та звукові подразники, координація рухів не відрізнялася від контрольної групи. Таким чином, PE_{50} відноситься до класу V «практично нетоксичні речовини» при внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревинному введенні [100, 130]. Це дозволяє вважати PE_{50} нетоксичним в діапазоні, що досліджували, та варіювати його дозами в широких межах.

Висновки до розділу 3:

1. Первинні скринінгові дослідження сухих екстрактів мучниці звичайної листя свідчать, що PE_{50} та PE_{90} виявляють гіпоглікемічну активність, але дія їх у різних дозах, які застосовувалися, не рівноцінна. Отже, PE_{50} виявив найбільшу гіпоглікемічну активність у дозі 100 мг/кг, тому саме цій екстракт був обраний для подальшого вивчення та модифікації.

2. За результатами проведеного фармакологічного скринінгу відібрані найбільш перспективні сухі екстракти мучниці звичайної листя з додаванням амінокислот для подальших поглиблених досліджень: встановлено що найбільшу гіпоглікемічну активність серед досліджуваних об'єктів виявили $PE_{арг}$ та $PE_{цис}$.

3. Результати токсикологічних досліджень дозволяють зробити висновок про низьку токсичність досліджуваних об'єктів. Було встановлено, що середньолетальні дози PE_{50} перевищують 5000 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні та 1000 мг/кг при внутрішньоочеревинному введенні, що дозволяє віднести PE_{50} до класу V – «практично нетоксичні речовини».

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Kravchenko G., Matar M., Krasilnikova O. Screening of Bearberry leaves extracts hypoglycemic effect and study of acute toxicity. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 2 (55). С. 13-16. DOI: <https://doi.org/10.24959/ubphj.18.173>. (Особистий внесок – брав участь в

- проведенні експерименту, узагальненні результатів експерименту та підготовці статті).
2. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves / N. Chaika, M. Matar, O. Koshovyi, G. Kravchenko, O. Goryacha, I. Kireyev, S. Kovalenko, R. Darmograi. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 3 (31). С. 42–50. (Scopus) <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939> (Особистий внесок – брав участь в проведенні експерименту та узагальненні його результатів).
 3. Kravchenko G.B., Matar M. Study of Bearberry Leaves Polyphenol Extracts Acute Toxicity. V *Національний з'їзд фармакологів України: тези доповідей*, 18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя. ВГО «Асоціація фармакологів України», 2017. С. 72-73.
 4. Вивчення хімічного складу та фармакологічної активності сухого екстракту листя мучниці звичайної / Н.Б Чайка., О.М. Кошовий, М.А. Комісаренко, М. Матар, А.Б. Кравченко. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф.*, 30-31 березня 2017, м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2017. Т. 2. С. 350-351.
 5. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry / Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. *Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy*, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018. Kaunas, 2018. P. 40.
 6. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням амінокислот. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф.* 12-13 березня 2020, м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 334-336.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ НА МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ У ТВАРИН З ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНІСТЮ

ЦД2 – це гетерогенне захворювання, результатом якого є аномально високий рівень глюкози в крові. Гіперглікемія, що супроводжується аутоокисленням глюкози, індукує оксидативний стрес, що веде до пошкодження фосфоліпидов плазматичних мембран тканин-мішеней та бета-клітин острівців Лангерганса. Патогенез ЦД2 характеризується системним порушенням метаболізму та супутніми клінічними ускладненнями.

В цьому розділі ми обговорюємо та наводимо результати експерименту з вивчення гіпоглікемічної, гепатопротекторної, антиоксидантної та гіполіпідемічної дії екстрактів мучниці звичайної листя за умов експериментальної ІР.

4.1. Вплив ПЕарг та ПЕдис на метаболічні зміни у щурів за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Відтворюваність індукованої глюкокортикоїдами резистентності до інсуліну була продемонстрована не лише в експериментах на тваринах, але й експериментах *in vitro* з використанням ізолюваних або культивованих клітин [131]. Кортикостероїди можуть викликати ІР шляхом прямого втручання в різні компоненти інсулінового сигнального каскаду [132]. Тому їхній негативний вплив є мультифакторним і призводить до підвищеної резистентності до інсуліну чутливих тканин, толерантності до глюкози, зменшення маси та дисфункції бета-клітин [133]. Глюкокортикоїди знижують периферичне захоплення глюкози у м'язах і жирової тканини, при цьому стимулюють ліполіз в жирової тканини [134]. Печінка відіграє важливу роль у контролі метаболізму глюкози, підтримуючи глікемію натще. Кортикостероїди збільшують ендогенне утворення глюкози безпосередньо шляхом активації численних генів, що

кодують ферменти гліюконеогенезу у печінці [135]. Все це призводить до гіперглікемії, що супроводжується активацією синтезу ТГ у печінці і, як наслідок, активацією утворення ЛПІ та посилення їх транспорту. Порушення балансу між процесами синтезу ЛПІ та їх катаболізмом у клітинах-мішенях є головною причиною розвитку дисліпідемічного стану в організмі тварин за умов експерименту [136].

4.1.1 Вивчення гіпоглікемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов експериментальної дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Контроль глікемічного стану тварин через 5 тижнів після початку введення дексаметазону спостерігалось значне підвищення рівня глюкози в крові. Саме з цього тижня було почате внутрішньошлункове введення всіх досліджуваних субстанцій (табл.4.1.)

Таблиця 4.1.

Концентрація глюкози та імунореактивного інсуліну в крові щурів за умов дексаметазон-індукованої інсуліноре+-зистентності та при введенні ПЕарг та ПЕцис

Групи/ показники	Час							
	ІК	Декс_5 (5 тиж)	Декс_7 (7 тиж)	7й тиждень				
				Декс_ПЕ	Декс_ПЕарг	Декс_ПЕцис	Декс_арф	Декс_мет
Глюкоза, ммоль/л	4,03 ±0,31	6,97 ±0,57*	7,34 ±0,51*	5,98 ±0,49*	5,54 ±0,37#	5,63 ±0,39#	5,87 ±0,65 */#	5,38 ±0,43 #
ІРІ, пмоль/л	77 ±5	101 ±9*	117 ±11*	79 ±9#	80 ±8#	79 ±6#	87 ±7#	70 ±5#
НОМА- IR	1,99 ±0,65 (N<3,0)	4,51 ±0,97*	5,50 ±1,11*	2,89 ±0,67*	2,84 ±0,34#	2,88± 0,27#	3,27± 0,45*	2,42± 0,29#

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс_7 ($p \leq 0,05$)

Наприкінці 7го тижня в групі Декс введення ПЕцис та ПЕарг знизило рівень базальної глікемії на 20,3 % та 21,5 %, відповідно. Але, введення ні досліджуваних екстрактів, ні референс-препарату метформіну, який незначно, але був більш ефективним, не призвело до повного повернення концентрації глюкози до вихідного рівня.

Максимальне підвищення рівня глюкози в дослідних групах спостерігалось на 60-й хвилині після навантаження глюкозою, однак у щурів, які отримували ПЕарг і ПЕцис, ці показники були достовірно нижчими порівняно з групою Декс на 54,2% і 51,8% відповідно. Причому на 90-й хв експерименту рівень глюкози у зазначених групах достовірно знизився, а на 120-й хв досяг вихідного рівня.

Розмір AUC, яка була розрахована на основі ОТТГ показав, що на тлі ін'єкцій дексаметазону порушується толерантність до глюкози. AUC групи Декс в 2,8 разів перевищило цей показник групи ІК. Введення ПЕарг та ПЕцис суттєво вплинуло на чутливість тканин до глюкози – AUC на 52,92% та 50,71%, відповідно, менше чим в групі Декс. Введення метформіну також значно послабило наслідки толерантності до глюкози – на 54,56%. Під час ОГТТ у групі Декс концентрація глюкози досягала максимуму на 60-й хв експерименту, а до 120-ї хв залишалася значно вищою за вихідний рівень, що свідчить про наявність ІР.

Було виявлено, що значення AUC у щурів групи Декс було принаймні в 3 рази більше, ніж відповідна площа в ІК. Слід також зазначити, що пероральний прийом досліджуваних речовин протягом 14 діб у групах щурів Декс_ПЕарг і Декс_ПЕцис призводив до достовірного зниження концентрації глюкози на 36,5% і 35,1% відповідно. Спостережуваний ефект перевищував ефект ПЕ₅₀ (26,45%) і наближався до результату, який спостерігався в групі Декс_мет (38,2%).

Порушення толерантності до глюкози за умов ІР може бути наслідком декількох причин. По-перше, дексаметазон знижує чутливість бета-клітин до

глюкози шляхом зниження рівня GLUT2, що, таким чином, призведе до втрати активності регуляції глюкози бета-клітинами ПЗ [137].

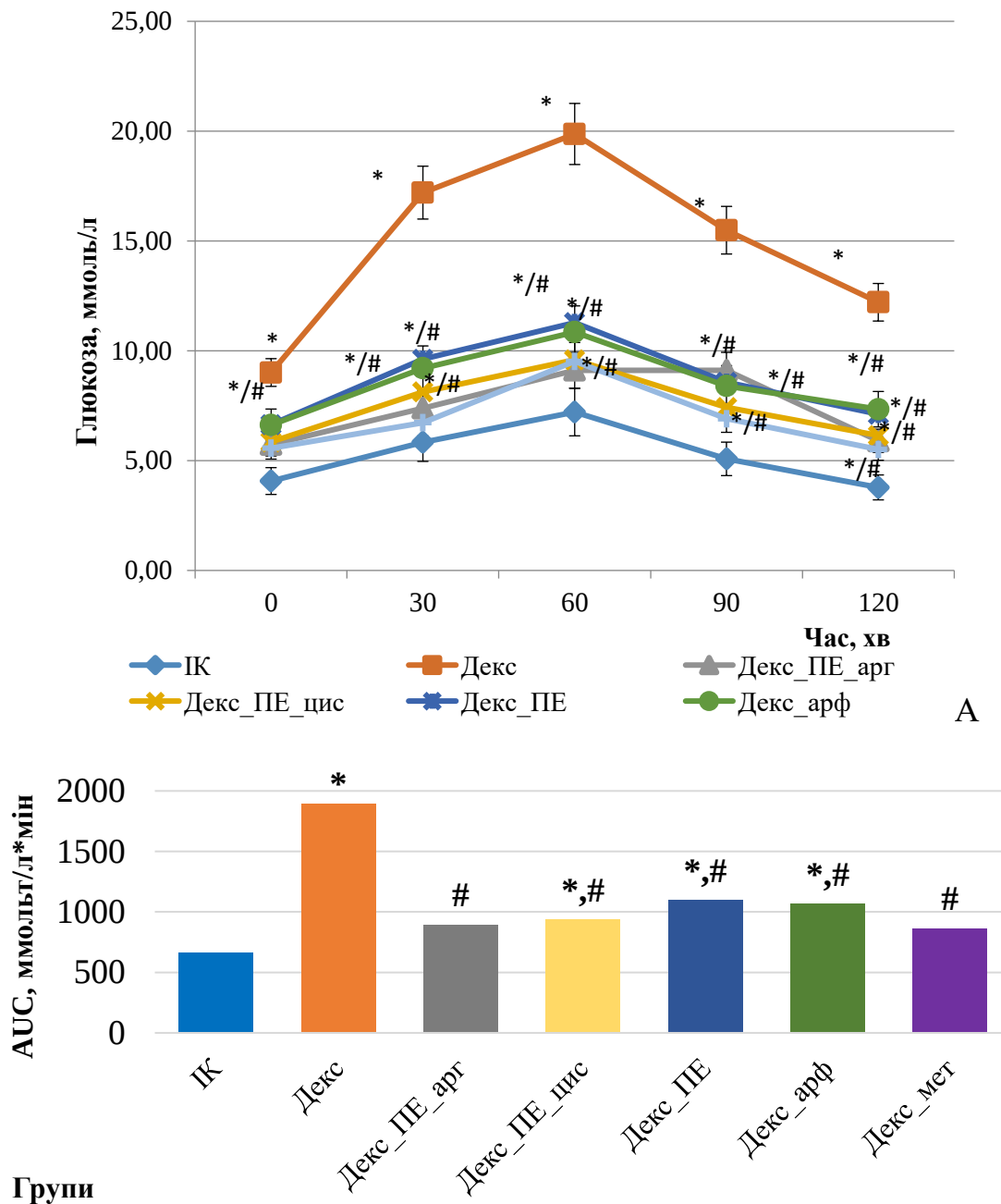


Рис. 4.1. Пероральний тест на толерантність до глюкози за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності. А – гіпоглікемічні криві, Б - розрахунок AUC.

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

По-друге, дексаметазон індукує в печінці посилення глюконеогенезу. Таким чином, за даних експериментальних умов розвивається гіперглікемічний стан, що, найімовірніше, супроводжується зниженням чутливості бета-клітин до глюкози [137]. Застосування досліджуваних субстанцій та препаратів порівняння з різним ступенем пригнічувало гіперглікемічний ефект дексаметазону.

4.1.2 Вивчення гіполіпідемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Таблиця 4.2.

Вплив ПЕарг та ПЕцис на ліпідний спектр сироватки крові за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Групи/показники	ЗЛ г/л	ТГ, ммоль/л	Хс ммоль/л	ЛПНГ-Хс, ммоль/л	ЛПВГ-Хс, ммоль/л
ІК	1,71±0,09	0,61±0,05	1,71±0,08	2,35±0,22	0,97±0,06
Декс	2,73±0,35*	1,19±0,09*	2,39±0,19*	3,58±0,28*	0,62±0,03*
Декс_ПЕ	2,11±0,17#	0,84±0,07#	2,04±0,12	3,11±0,23	0,73±0,05
Декс_ПЕарг	2,01±0,15#	0,65±0,04#	1,94±0,09#	2,76±0,17#	0,81±0,06#
Декс_ПЕцис	1,97±0,21#	0,68±0,06#	1,83±0,08#	2,56±0,21#	0,89±0,08#
Декс_арф	2,26±0,25	0,73±0,06#	2,06±0,21	3,21±0,25	0,79±0,07
Декс_мет	1,85±0,11#	0,67±0,08#	1,78±0,09#	2,51±0,19#	0,89±0,06#

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Концентрація Хс в сироватці крові достовірно збільшувалася на тлі введення дексаметазону, а при введенні поліфенольних екстрактів з додаванням цистеїну та аргініну зменшувалася до нормальних показників. Однак, в той же час інші фракції зазнали значних змін. Так, в умовах дексаметазон-індукованої ІР вміст ЗЛ в сироватці крові збільшився на 77,3%, на тлі введення ПЕарг та

ПЕцис протягом 2 тижнів зростання становило лише 29,6% та 25,3% відповідно, порівняно з тими тваринами, які отримували ін'єкції дексаметазону. Спостерігалось зниження концентрації ЛПВЩ-Хс, але введення ні ПЕарг, ні ПЕцис, ні препаратів порівняння не змогло повністю нормалізувати цей параметр. Рівень ЛПНЩ-Хс знижувався при введенні досліджуваних екстрактів, з достовірним зниженням на 23,1 % та 29,5 % (відповідно ПЕарг та ПЕцис). Що стосується ТГ сироватки крові, то 7-ми тижневе введення дексаметазону підвищило його рівень майже в два рази ТГ – ПЕарг, ПЕцис та референтний препарат метформін достовірно зменшили гіпертригліцеридемію, спричинену дексаметазоном, на 35%, 42% та 48% відповідно (табл. 4.2.). Цей експеримент ще раз підтвердив розвиток дісліпідемії за умов ІР, подібної до такої у хворих на ЦД2. Введення як ПЕарг, так і ПЕцис знизило рівень ТГ та ВЖК у сироватці крові на порівняно з групою контрольної патології (група Декс).

4.1.3 Дослідження гепатопротекторної активності ПЕарг та ПЕцис за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Ферменти, що беруть участь у метаболізмі амінокислот – АсАТ і АлАТ виявляють високу активність у гепатоцитах. Тому для діагностики гострого та хронічного ураження печінки найчастіше визначають їхню активність у крові, навіть якщо воно носить субклінічний характер. ГГТП – це мембранозв'язаний фермент, який є активним в органах з посиленою функцією секреції і резорбції. ЛФ – фермент, що також присутній у всіх органах і тканинах організму, особливо багато її в печінці та жовчних протоках [138].

У крові підвищення активності ГГТП та ЛФ може бути ознакою ураження гепатобіліарної системи або пов'язане з ішемічним пошкодженням тканин. Численні дослідження вказують на значне підвищення активності АлАТ та АсАТ у сироватці крові у пацієнтів хворих ЦД2, підвищення активності ГГТП у сироватці крові також може бути негативним наслідком розвитку ЦД2.

Після 7 тижнів щоденних ін'єкцій дексаметазону було зафіксовано, що рівень активності АЛАТ, АсАТ та достовірно підвищилася в сироватці крові в 2,07 та 1,55 разів, відповідно, порівняно з ІК групою (табл. 4.1.3). Активність ферментів сироватки крові показала суттєві зміни до кінця експерименту.

У цьому дослідженні ми виявили, що всі введені сполуки знижували активність ферментів у крові (табл. 4.3.). Отримані дані узгоджуються з нашими попередніми даними та даними літератури [139].

Таблиця 4.3.

Вплив ПЕарг та ПЕцис на активність печінкових ферментів в сироватці крові щурів за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Групи/ показники	АЛАТ ммоль/г л	АсАТ ммоль/г л	ГГТ ммоль/г л	ЛФ мккат/л
ІК	0,76±0,06	0,56±0,03	3,09±0,25	3,25±0,26
Декс	1,58±0,09*	0,87±0,06*	6,55±0,37*	4,63±0,32*
Декс_ПЕ	1,15±0,11	0,68±0,05	4,23±0,31#	3,74±0,25
Декс_ПЕарг	0,79±0,05#	0,49±0,03#	3,71±0,36#	3,48±0,31#
Декс_ПЕцис	0,82±0,07#	0,47±0,02#	3,74±0,19#	3,53±0,29#
Декс_арф	0,99±0,06#	0,72±0,05	4,67±0,28	3,56±0,21#
Декс_мет	1,17±0,09#	0,61±0,02#	4,01±0,35#	3,74±0,19#

Примітки: #

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Ін'єкції дексаметазону протягом 7 тижнів викликали достовірне збільшення ТБАР та ДК, порівняно зі здоровими тваринами, що однозначно вказує на розвиток оксидативного стресу. В гомогенаті печінки тварин групи Декс спостерігалася значне зниження вмісту ВГ порівняно з інтактним контролем (табл. 4.4.). Крім вмісту глутатіону в печінці, введення дексаметазону істотно вплинуло на активність ферментів антиоксидантного захисту.

Таблиця 4.4.

Вплив ПЕарг та ПЕцис на показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу печінки щурів за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Групи / показники	ТБК-АП, нмоль/мг білка	ДК, нмоль/мг білка	ГлВ, нмоль/мг тканини	КАТ, μмоль/мг білка	СОД, ОД/мг білка	ГП, ОД/мг білка
ІК	123 ±13	93,7 ±11,3	91,4 ±7,2	3,01 ±0,05	79,2 ±7,2	44,22 ±5,63
Декс	335 ±47*	149,1 ±15,1*	63,1 ±5,5*	1,69 ±0,08*	37,6 ±2,1*	21,4 ±1,83*
Декс_ПЕ	237 ±21*/#	117,1 ±12,3#	75,9 ±9,3#	2,5 ±0,09#	52,3 ±5,9#	34,52 ±4,23*/#
Декс_ПЕарг	207 ±19*/#	98,1 ±3,8#	83,2 ±6,2#	2,13 ±0,08*/#	58,2 ±4,9#	37,12 ±5,16#
Декс_ПЕцис	159 ±12#	90,3 ±4,5#	86,5 ±7,2#	2,25 ±0,03#	66,1 ±3,1#	41,37 ±2,18#
Декс_арф	245 ±28*/#	111,2 ±9,3	71,4 ±5,5*	1,95 ±0,05*	59,1 ±4,1#	33,56 ±4,53*/#
Декс_мет	229 ±21*/#	97,3 ±5,2#	82,7 ±4,3#	1,96 ±0,04*/#	49,9 ±3,1*/#	38,54 ±3,25#

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Введення ПЕарг та ПЕцис протягом 2х тижнів, підвищило активність КАТ в печінці на 26% та 36%, відповідно. Натомість цей же параметр був значно нижче в групі Декс_мет. Подібним чином введення ПЕцис підвищило активність СОД в печінці на 108%. Жоден з досліджуваних екстрактів не вплинув на цей параметр в печінці, хоча спостерігається тенденція до значного підвищення концентрації порівняно як з інтактним контролем (125%), так і з тваринами, які отримували дексаметазон (176%). Цей самий параметр також був збільшений при введенні збору «Арфазетин» та метформіну порівняно з тваринами групи Декс, але ці збільшення не були значущими. Відповідно, у цьому дослідженні введення дексаметазону викликало помітне зниження в тканині печінки. Введення ПЕарг та ПЕцис має тенденцію відновлювати вміст в печінці, але його

ефект був значним лише в печінці. Крім того, не вдалося запобігти втраті маси тіла, спричиненій дексаметазоном. Ці результати свідчать про те, що ПЕ не здатний ефективно перешкоджати розвитку патологічних процесів, що викликають зміни, які спостерігалися формуванні ІР при введенні дексаметазону. Ці результати були дещо несподіваними, враховуючи, що одним із основних шляхів, що ведуть до втрати маси тіла, є резистентність до інсуліну, яка сильно пригнічує IGF-1- залежний синтез м'язового білка [140]. Результати цього дослідження показали, що значно та залежно від дози зменшує гіперглікемію, спричинену введенням дексаметазону. Крім того, також суттєво і повністю коригував порушення толерантності до глюкози, викликане дексаметазоном.

Таким чином, міг скоригувати втрату маси тіла, пов'язану з резистентністю до інсуліну. Окислювальний стрес відіграє важливу роль у розвитку та ускладненнях ЦД2. Окислювальний стрес спричиняє пошкодження і біологічних молекул, і клітинних органел, більшою мірою, завдяки накопиченню АФК. У цьому дослідженні розвиток окислювального стресу був підтверджений підвищенням рівня ТБК-АП та ДК в гомогенаті печінки. На тлі гіперглікемії саме в печінці виробництво різних відновлюючих цукрів, таких як глюкоза-6-фосфатів і фруктози збільшується через гліколіз і поліолові шляхи [141]. Під час цього процесу можуть утворюватися АФК і спричиняти пошкодження тканин. Кінцеві продукти розширеного глікування, що утворюються внаслідок гіперглікемії, також можуть взаємодіяти зі специфічними рецепторами на мембранах для генерації оксидантів [142]. В цих умовах важливо функціонування антиоксидантної системи. У нинішньому дослідженні ми спостерігали достовірне зменшення рівня ГлВ.

4.2 Вплив ПЕарг та ПЕдис на метаболічні зміни у щурів з інсулінорезистентністю, яка індукована високофруктозною дієтою

За умов високофруктозної дієти, при значному підвищенні калорійності раціону відносно швидко проявляються метаболічні зміни. Після 7-тижневого застосування 20% фруктози в питній воді у дорослих самців щурів розвинулася резистентність до інсуліну, а також спостерігалася надмірна вага тіла, що якраз і є ціллю та відтворюється в аналогічних моделях для гризунів.

Оскільки фруктоза не стимулює секрецію інсуліну бета-клітинами ПЗ, надмірне споживання фруктози, призводить до зниженої постпрандіальної секреції інсуліну, ніж споживання вуглеводів, що містять глюкозу. Виробництво лептину регулюється реакцією інсуліну на прийом їжі, тому споживання фруктози також знижує концентрацію циркулюючого лептину. Комбінований вплив зниженого циркулюючого лептину та інсуліну призводить до збільшення ваги та пов'язаних з цим метаболічних наслідків. Крім того, фруктоза, порівняно з глюкозою, переважно метаболізується до ліпідів у печінці [143]. Споживання фруктози викликає резистентність до інсуліну, порушення толерантності до глюкози, гіперінсулінемію та гіперліпідемію на тваринних моделях.

У контексті високого споживання фруктози у продуктах харчування та напоях вивчення механізмів впливу фруктози на організм є надзвичайно актуальним питанням. Саме включення фруктози до метаболічних шляхів через фруктозо-1-фосфат (реакція фосфорилування каталізується фруктокіназою) минає реакцію, що каталізується фосфотрикарбоксилатом – ферментом, який контролює швидкість катаболізму глюкози. Це пояснює активацію синтезу жирних кислот в печінці, а також їхньої етерифікації з утворенням тригліцеридів. У ході метаболізму фруктози відбувається накопичення коротких молекул, які використовуються в процесі ліпогенезу [144]. Сюди можна віднести і накопичення ацетил-КоА, який є прекурсором для синтезу Хс, кетонових тіл, ВЖК, а також вступити у цикл трикарбонових кислот, а при його надлишку. Ці обставини пояснюють високі рівні ТГ, ВЖК та Хс, які були зафіксовані в сироватці крові щурів групи ВФД в нашому експерименті. Екстракти, що досліджувалися – Пеарг та ПЕдис мали гіполіпідемічний ефект.

Тому, індукована споживанням фруктози ІР у щурів вважається гарною моделлю для попереднього дослідження засобів, націлених на лікування ЦД2, і широко використовується. Ця модель широко використовується для оцінки *in vivo* антигіперглікемічного потенціалу різних агентів.

4.2.1 Вивчення гіпоглікемічної активності ПЕарг та ПЕцис на тлі інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою

Метаболізм фруктози в печінці впливає не тільки на обмін ліпідів, але і на обмін вуглеводів в організмі. Вважається, що в бета-клітинах ПЗ відсутній переносник для фруктози (GLUT5), тому фруктоза, на відміну від глюкози, не стимулює секрецію інсуліну. Також фруктоза не стимулює секрецію лептину. Одним з вірогідних метаболічних шляхів перетворень фруктози є утворення тріозофосфатів, які можуть прийняти участь у гліюконеогенезі, тим самим вносячи свій вклад в гіперглікемію.

Таблиця 4.5.

Концентрація глюкози та імунореактивного інсуліну в крові щурів за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою, та при введенні ПЕарг та ПЕцис

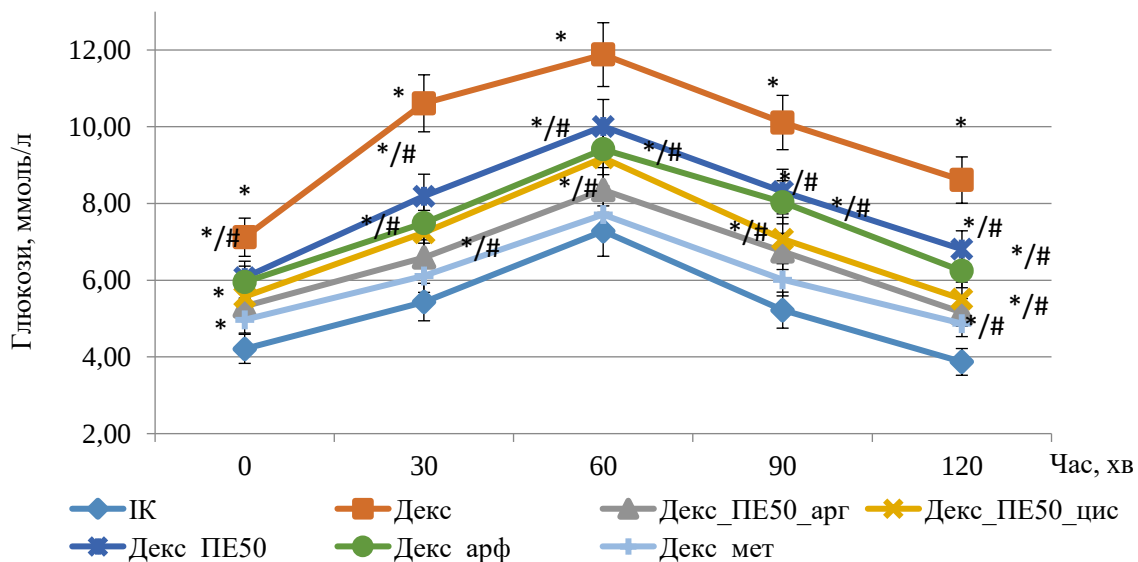
Групи/ показники	Час							
	ІК	Декс_5 (5 тиж)	Декс_7 (7 тиж)	7й тиждень				
				Декс_ПЕ	Декс_ПЕарг	Декс_ПЕцис	Декс_арф	Декс_мет
Глюкоза, ммоль/л	4,17 ±0,65	6,27 ±0,79*	7,01 ±0,93*	5,57 ±0,56* /#	5,38 ±0,49*	5,49 ±0,23*	5,53 ±0,46*	5,35 ±0,44
ІРІ, пмоль/л	72 ±7	97 ±8*	109 ±11*	78 ±5*/#	77 ±9*	78 ±8	87 ±7*	73 ±6
НОМА- ІР	1,92 ±0,12 (N<3,0)	3,89 ±0,29*	4,86 ±0,31*	2,73 ±0,34* /#	2,65 ±0,31* /#	2,75 ±0,35* #	3,08 ±0,19*	2,40 ±0,25* /#

Примітки:

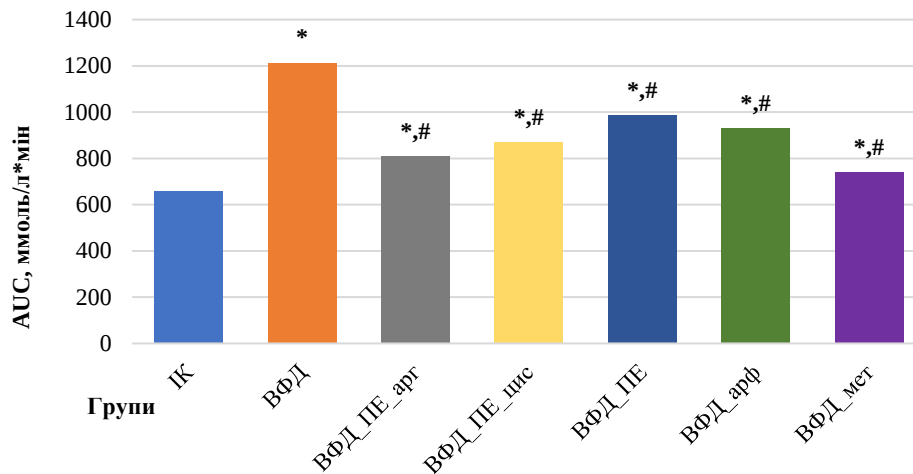
* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс_7 ($p \leq 0,05$)

У ВФД групи щурів було зафіксоване підвищення рівня глюкози натще порівняно з інтактними тваринами (табл. 4.5.). Проведений ОТТГ підтвердив розвиток ІР у тварин групи ВФД, оскільки ми спостерігали значне підвищення рівня глюкози не лише на 30, 60 та 90 хв експерименту, але навіть до 120 хв рівень глюкози не повертався до початкового рівня. Водночас введення досліджуваних екстрактів здоровим тваринам істотно не впливало на цей показник. Проте пероральне навантаження глюкозою виявило певну різницю в процесі утилізації глюкози. Таким чином, введення ПЕарг та ПЕцис викликало достовірну різницю на 90-й хвилині ОТТГ рівня глюкози порівняно з групою ІК; це було викликано ймовірною стимуляцією поглинання глюкози клітинами. Тим не менш, ми були зацікавлені у вивченні впливу досліджуваних речовин на толерантність до глюкози при експериментально індукованому ІР. ОГТТ з розрахунком AUC є інформативним тестом для оцінки потенційної гіпоглікемічної активності. На рис. 1 представлені результати ОГТТ у щурів із індукованим Dex ІР та при введенні поліфенольних екстрактів.



А



Б

Рис. 4.2. Пероральний тест на толерантність до глюкози за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою. А – гіпоглікемічні криві. Б -розрахунок AUC.

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи ВФД ($p \leq 0,05$)

Однак, після введення ПЕарг щурам з ІР вищезазначені параметри відновилися майже до таких у ІК групи. Фітосполуки можуть викликати гіпоглікемічну дію шляхом потенціювання ефекту інсуліну, або шляхом збільшення панкреатичної секреції інсуліну з бета-клітин, або через його вивільнення із зв'язаного інсуліну, тоді як вони діють через позапанкреатичний механізм шляхом інгібування епатичного утворення глюкози або корекції резистентності до інсуліну [145]. Досліджувані екстракти імовірно, виходячи з їхнього складу могли діяти через один із вищезазначених механізмів, який бере участь у стабілізації рівня інсуліну, зниження гіперглікемії в крові у щурів з ІР. У групі ВФД (рис. 4.2.) базальний рівень глюкози достовірно, у 1,69 рази, перевищував показники ІК групи. Це відбилося на площі AUC, яка була вдвічі більшою, ніж у інтактних тварин. Введення ПЕарг та ПЕцис тваринам з ІР нормалізувало рівень глюкози. При цьому спостережуваний ефект перевищував ефект збору «Арфазетин» і був порівнянний з дією метформіну. ОТТГ у групах

ВФД_ПЕарг і ВФД_ПЕцис показав, що підвищення глюкози, визначене на 30-й та 60-й хвилині, було значно нижчим порівняно з групою ВФД, а до 120-ї хвилини знизилося до вихідного рівня. Ефект ПЕарг і ПЕцис, що спостерігався на 120-й хвилині після навантаження глюкозою, був вірогідно вищим за аналогічний показник екстракту ПЕ₅₀. Таким чином, ОТТГ показав зниження глюкози на 30, 60 і 120 хв тесту, на що вказує достовірне зниження площі АUC (рис. 4.2.).

4.2.2 Вивчення гіполіпідемічної активності ПЕарг та ПЕцис за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою

Дисліпідемія, яка супроводжує ЦД2 має певні зміни ліпідного спектру. Основні ознаки дисліпідемії визначаються гіпертригліцеридемією, низькими рівнями холестерину ЛПВЩ і трохи високими або нормальними рівнями холестерину ЛПНЩ із зміненним складом. Загальновідомо, що інсулін не пригнічує синтез часточок ЛПДНЩ. ІР значною мірою пов'язана зі збільшенням синтезу ліпідів у печінці, збільшенням надходження ВЖК до печінки [146].

Високофруктозна дієта призводила до значного зростання загального холестеролу, триацилгліцеролів та загальних ліпідів в сироватці крові, при цьому холестерол ЛПНЩ збільшився практично у 3 рази, а холестерол ЛПВЩ зменшувався в 1,52 рази. Введення ПЕарг зменшувало вміст загального холестеролу на 53,5%, а холестеролу ЛПНЩ на 38,5%, в той же час вплив ПЕцис відбувався зниженням цих показників відповідно на 59,2% та 57,9% ($p < 0,05$). Таким чином, ПЕцис виявив більш виразну гіполіпідемічну дію (табл. 4.6.)

Таблиця 4.6.

Вплив ПЕарг та ПЕцис на ліпідний спектр сироватки крові за умов інсулінорезистентності, яка викликана високофруктозною дієтою

Групи / показники	ЗЛ г/л	ТАГ, ммоль/л	Хс ммоль/л	ЛПНГ-Хс, ммоль/л	ЛПВГ-Хс, ммоль/л
ІК	1,81±0,09	0,62±0,06	1,77±0,11	2,04±0,25	1,03±0,11
ВФД	2,81±0,23*	1,19±0,09 *	2,93±0,15*	3,35±0,28*	0,79±0,09*
ВФД_ПЕ	2,49±0,17	0,84±0,04 */#	1,94±0,09#	2,87±0,21	0,89±0,08
ВФД_ПЕарг	2,29±0,11*/#	0,67±0,03 #	1,84±0,11#	2,47±0,18*/ #	0,91±0,08#
ВФД_ПЕцис	1,93±0,08#	0,68±0,05 #	1,83±0,09#	2,22±0,14#	0,93±0,07#
ВФД_арф	2,56±0,22*	0,73±0,09 #	1,96±0,11#	2,76±0,21	0,87±0,06*
ВФД_мет	1,85±0,14#	0,67±0,04 #	1,81±0,13#	2,56±0,23#	1,00±0,09#

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

4.2.3 Дослідження гепатопротекторної активності ПЕарг та ПЕцис за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою

Зв'язок між оксидативним стресом і ІР привернув увагу дослідників багато років тому. Оксидативний стрес відіграє основну роль у патогенезі ІР через порушення інсулінових сигналів і дисрегуляцію адипоцитокінів [147]. Багато доказів свідчать про те, що надмірне виробництво АФК може спричинити резистентність до інсуліну, що підтверджується лікуванням вдалим ІР за допомогою сполук, які мають антиоксидантні властивості [148]. Дослідження показують, що антиоксиданти знижують рівень інсуліну, глюкози, ТГ у плазмі крові та покращують резистентність до інсуліну, існує тісний зв'язок оксидативного стресу з ускладненнями цукрового діабету [149].

Активність як АЛТ, так і АСТ виявилася значно вищою в групі ІР порівняно з інтактними тваринами (табл.4.7).

Таблиця 4.7.

Дослідження гепатопротекторної активності за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою та при введенні ПЕарг та ПЕцис

Групи / показники	АлАТ ммоль/г л	АсАТ ммоль/г л	ГГТ ммоль/г л	ЛФ мккат/л
ІК	0,81±0,06	0,56±0,03	3,09±0,31	3,25±0,26
ВФД	1,98±0,11*	0,87±0,04*	6,55±0,43*	4,63±0,37*
ВФД_ПЕ	1,14±0,09#	0,68±0,04	4,23±0,25*/#	3,74±0,24#
ВФД_ПЕарг	0,97±0,05#	0,49±0,02#	3,71±0,26#	3,48±0,27#
ВФД_ПЕцис	1,01±0,08*/#	0,47±0,02#	3,74±0,29#	3,53±0,35#
ВФД_арф	0,99±0,07#	0,72±0,04*	4,67±0,34*/#	3,56±0,28#
ВФД_мет	1,07±0,08#	0,61±0,03#	4,01±0,31*/#	3,74±0,29*/#

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи ВДФ ($p \leq 0,05$)

Антиоксидантна система є захисним механізмом клітини від пошкодження вільними радикалами. Антиоксидантні ферменти, зокрема, складають основну частину цього захисного механізму. СОД детоксикує радикали спероксиду, підвищене виробництво H_2O_2 під час оксидативного стресу може бути нейтралізовано КАТ та Гл. Глутатіонпероксидаза має дуже чутливу функцію для розкладання пероксидів ліпідів, перетворює H_2O_2 на воду за допомогою тіолової групи глутатіону. Детоксикація H_2O_2 відіграє важливу роль у запобіганні акумуляції ПОЛ і регуляції окисно-відновного статусу клітин [150].

В нашому дослідженні спостерігалось значне зниження активності СОД, КАТ та ГП, рівня ГлВ разом зі збільшенням ТБК-АП та ДК у гомогенаті печінки щурів групи ВДФ. Вказані показники були достовірно нижчими в групах ВДФ_ПЕарг, ВДФ_ПЕцис, ВДФ_ПЕ, ВДФ_мет, ВДФ_арф. Активності КАТ, СОД і ГП зростали разом з підвищенням рівня ГлВ (табл. 4.8.).

Таблиця 4.8.

Вплив ПЕарг та ПЕцис на показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу печінки щурів за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою

Групи / показники	ТБК-АП, нмоль/мг білка	ДК, нмоль/мг білка	ГлВ, нмоль/мг тканини	КАТ, μмоль/мг білка	СОД, ОД/мг білка	ГП, ОД/мг білка
ІК	119 ±9	90,2 ±6,3	85,3 ±6,2	2,87 ±0,06	91,3 ±6,1*	39,17 ±3,62
ВФД	298 ±16*	151,9 ±15,6*	55,9 ±5,4*	1,54 ±0,09*	41,2 ±1,10	16,4 ±2,94*
ВФД_ПЕ	243 ±35#	127,1 ±12,3*/ #	72,2 ±6,3*/#	2,32 ±0,09#	57,5 ±15,9*/#	29,63 ±4,23*/#
ВФД_ПЕарг	226 ±25*/#	112,1 ±9,8#	65,9 ±5,2#	1,94 ±0,07*/#	64,3 ±7,9*/#	32,08 ±4,23#
ВФД_ПЕцис	178 ±16*/#	90,3 ±4,5#	63,2 ±7,1#	2,48 ±0,11#	67,9 ±7,9#	36,05 ±1,18#
ВФД_арф	235 ±18*/#	93,7 ±11,3	74,5 ±7,3*/#	2,44 ±0,29#	61,7 ±5,1*/#	25,14 ±3,43*/#
ВФД_мет	171 ±9*/#	149,1 ±15,6*	65,8 ±5,9#	2,07 ±0,19*/#	56,2 ±4,9#	24,6 ±2,19*/#

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи ВДФ ($p \leq 0,05$)

Ін'єкції дексаметазону мали більш виражений вплив на концентрацію глюкози в крові порівняно з високофруктозною дієтою, але обидві моделі були ефективними. Загальна тенденція, яка спостерігалася при введенні екстрактів мучниці листя, показала, що вони оказували позитивний вплив на показники глікемічного стану тварин, чутливість клітин-мішеней до інсуліну, процеси метаболізму ліпідів. Ці результати можуть бути свідченням активації процесів утилізації глюкози, а це, у свою чергу, свідчить про покращення чутливості до інсуліну за рахунок дії компонентів досліджуваних екстрактів. Ефект, що спостерігався, опосередковується наявністю арбутину та фенольних

компонентів, які стимулюють поглинання глюкози клітинами, а також наявністю амінокислот, які нормалізують процеси передачі сигналу, що покращує чутливість клітин-мішеней до інсуліну.

Висновки до розділу 4

1. У результаті проведених фармакологічних досліджень доведена здатність ПЕарг та ПЕцис знижувати базальну глікемію та постпрандіальну глікемію в оральному тесті толерантності до глюкози у тварин з експериментальною інсулінорезистентністю. За ефективністю гіпоглікемічного ефекту за умов експериментальної інсулінорезистентності, як ПЕарг, так і ПЕцис переважають ПЕ₅₀, що вказує на потенціювання здібності одержаних субстанцій нормалізувати рівень глюкози в крові.

2. Встановлена здатність ПЕарг та ПЕцис коригувати дісліпідемію, яка розвивається за умов експериментальної інсулінорезистентності, що підтверджено нормалізацією показників ліпідного спектру крові (ЗЛ, ТГ, Хс, ЛПВЩ-Хс і ЛПНЩ-Хс).

3. Введення ПЕарг та ПЕцис попереджає розвиток оксидативного стресу в тканинах печінки та підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності пригнічуючи утворення активних форм кисню, і сприяє підвищенню активності ключових ферментів антиоксидантної системи (СОД, КАТ та ГП).

4. Дослідженнями встановлено позитивний вплив ПЕарг та ПЕцис на цілісність мембран гепатоцитів та жовчних каналців тварин з експериментальною резистентністю що підтверджується нормалізацією активності мембранозалежних ферментів – АлАТ, АсАТ та ГГТП, ЩФ в сироватці крові. Це свідчить про гепато- та мембранопротекторні властивості досліджуваних екстрактів.

5. Результати експериментів довели певні відмінності в активності досліджуваних екстрактів, так ПЕцис має більш виразну антиоксидантну та

гіполіпідемічну активність, однак, ПЕарг виявив більшу здатність до зниження рівня глюкози в крові на тлі інсулінорезистентності.

Результати проведених досліджень опубліковані в роботах:

1. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Study of bearberry leaves extracts hypoglycemic action under experimental insulin resistance in rats. Клінічна фармація. 2020. № 3 (24), С. 54-57. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).

2. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats. Медична та клінічна хімія. 2020. № 1 (22). С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).

3. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Матар М., Кравченко А.Б., Ковальова А.М., Кіреєв І.В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).

4. Matar M., Kravchenko G., Krasilnikova, O. Study of hepatoprotective effect of bearberry leaves extract under insulin resistance in rats. EUREKA: Health Sciences. 2021. № 6. Р. 48-53. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.002174>.

5. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на корисну модель № 142210 Україна. № u 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020, Бюл.№ 10 (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

6. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Мазен М., Чайка Н. Б. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на корисну модель № 142930 Україна. № у 2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020, Бюл.№ 13 (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

7. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід № 124042 Україна. № а 2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021, Бюл.№ 27 (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

8. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід № 124043 Україна. № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021, Бюл.№ 27 (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

9. Кравченко Г.Б., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів рослин сімейства вересових на моделі експериментальної інсулінорезистентності Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Медичні науки: історія розвитку, сучасний стан та перспективи досліджень 22-23 вересня 2017 м. Львів Стор. 59-61.

10. Kravchenko G. B., Krasilnikova O. A., Matar M. The Effect of Polyphenol Administration on Plasma Lipid Composition under Experimental Insulin Resistance. Prospects for the Development of Medicine in EU Countries and Ukraine: International scientific and practical conference, 21–22 December 2018, Wloclawek, Republic of Poland. Wloclawek: Izdevnieciba «Baltija Publishing», 2018. P. 99-101.

11. Matar M., Kravchenko G.B. Effect of Bearberry Leaves Polyphenol Extract on Some Lipid Indices under Experimental Insulin Resistance. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали II

Міжнар. наук.-практ. конф., 28-29 березня 2018 р., м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 13.

12. Matar M. Comparative Study of Bearberry Polyphenol Concentrates Effects on Antioxidant Status under Experimental Insulin Resistance in rats. Collection of Abstracts of IV International Scientific-Practical Conference of Students and Young Scientists «Science and Medicine: a Modern View of Youth» Almaty, 20-21 April, 2017 P. 257.

13. Matar M. Hepatoprotective Effect of bearberry Leaves Extracts under Dexamethasone Induced Insulin Resistance in Rats. Topical Issues of Experimental and Clinical Biochemistry: International Scientific and Practical Conference, 01 October, 2021, Kharkiv, Ukraine. X.: НФаУ, 2021. С. 271-272.

РОЗДІЛ 5

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ЇХНЯ КОРЕКЦІЇ ЕКСТРАКТАМИ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ

Як ми вже обговорювали вище, передбачуваним механізмом розвитку ЦД2 є ІР, яка полягає саме в зниженні біологічної відповіді клітин на один або кілька ефектів інсуліну за його нормальної або надлишкової концентрації в крові [151]. Здорові бета-клітини підшлункової залози (ПЗ) можуть адаптуватися до зниженої чутливості тканин до інсуліну та запобігати гіперглікемії натще шляхом збільшення секреції інсуліну, але в переддіабетичному стані та при ЦД2 швидкість, з якою глюкоза надходить у кров, перевищує швидкість поглинання глюкози тканинами. Проте можна зустріти різні точки зору щодо ролі функції бета-клітин ПЗ, а також розвитку ІР у патогенезі ЦД2 [152]. У будь-якому випадку, за сучасними уявленнями, розвиток ЦД2 є наслідком прогресуючого порушення функціональної активності бета-клітин ПЗ в умовах тривалої ІР [153]. Центральна роль бета-клітинної дисфункції в патогенезі ЦД2 незалежно від антидіабетичної терапії була підтверджена рядом клінічних досліджень [154]. Оскільки існуюча фармакотерапія ЦД2 не завжди запобігає зниженню функції бета-клітин, що неминуче призводить до порушення глікемічного контролю та прогресування діабетичних мікро- та макросудинних ускладнень, пошук нових фармакологічних засобів, здатних зберегти ендокринну функцію ПЗ, є особливо актуальним.

В цьому розділі наведені результати впливу сухих спиртових екстрактів мучниці звичайної листя з додаванням аргініну – ПЕарг та цистеїну – ПЕцис на морфофункціональний стан ПЗ за умов експериментальної ІР, а саме було проведене гістологічне дослідження, вивчені показники, які характеризують антиоксидантний стан ПЗ та, також, перерахована відносна маса ПЗ.

Підтвердження розвитку ІР при застосуванні як ін'єкцій дексаметазону, так і високофруктозної дієти, наведені в Розділі 4 при описі та обговоренні результатів експериментів.

5.1 Гістологічне дослідження підшлункової залози щурів групи інтактного контролю

Як показало гістологічне дослідження ПЗ інтактних щурів, екзокринна частина залози представлена часточками, між якими видно дуже вузькі сполучнотканинні перетинки. Паренхіму часточок складали ацинуси (кінцеві секреторні відділи залоз) з дуже високою щільністю розташування. Ацинуси складалися з одного шару залозистих клітин, для яких характерно розподіл на дві зони: базальну базофільну гомогенну зону, що містила округле, щільне ядро, та еозинофільну центральну зону, що містила зерна зимогену. Співвідношення зон коливалося у межах 1:1,5 – 1:2. Просвіт ацинусів дуже невеликий. Епітелій протоків звичайний, просвіт іноді поширено.

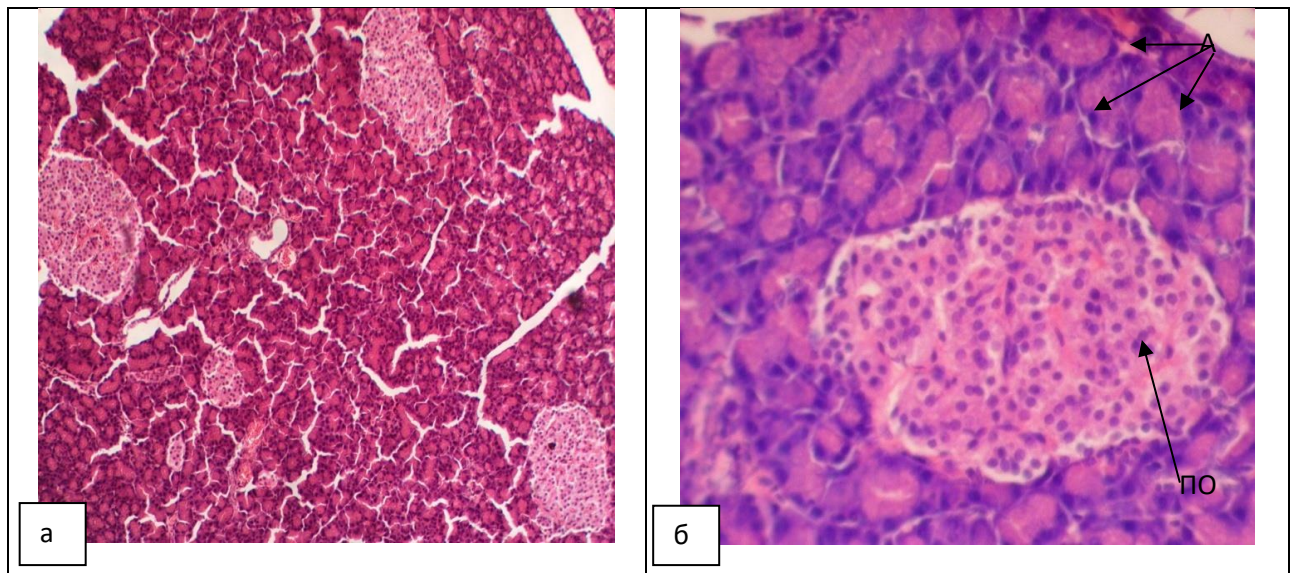


Рис. 5.1. Підшлункова залоза щура групи ІК: а – нормальний розподіл панкреатичних острівців за розміром; б – стан панкреатитів ацинусів (А) і інсуліноцитів острівця Лангергансу. Гематоксилін-еозин. а - x100, б - x250.

Острівці Лангерганса (панкреатичні острівці, ПО) є переважно округлої чи овальної форми, вони чітко відмежовані від навколишньої екзокринної паренхіми та складаються з набору світлих полігональних клітинних ниток. Між нитками клітин іноді видно загальні синусоїдальні капіляри. Основна частина острівцевих клітин (центральна частина) складається з бета-клітин. Альфа-клітини розташовані ланцюжком по периферії острівця (рис. 5.1.). Слід зазначити, що такий зональний розподіл альфа- і бета-клітин характерний для цього виду і відноситься до «плащового» типу острівців [155].

Як показали результати морфометрії оптична щільність ПО у щурів групи інтактного контролю дорівнювалася 19,33. Розмір їх коливався від великих до дрібних. У відсотковому відношенні островки розподілялися таким чином: 21,92% – дрібні, 68% – середні, 9,78% – великі (табл. 5.2.).

5.2. Морфофункціональні дослідження підшлункової залози за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності та після введення ПЕарг та ПЕцис

ІР та дисфункція бета-клітин є двома рушійними силами патогенезу ЦД2. Обидва патологічні стани впливають один на одного і, ймовірно, синергетично загострюють ЦД2 [156]. Збереження функції бета-клітин, чутливості бета-клітин до інсуліну та сигнальних шляхів інсуліну в тканинах-реципієнтах глюкози підтримуватимуть гомеостаз глюкози.

5.2.1 Вивчення динаміки змін маси тіла щурів та відносна маса підшлункової залози за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності

Середня маса тіла щурів з групи ІК до кінця 7-го тижня була значно вищою, ніж у щурів групи Декс; як, втім, і протягом усього експерименту. Так, достовірні відмінності у масі тіла зафіксовано вже на 3-му тижні (рис. 5.2.). Введення досліджуваних сполук давало можливість тваринам набирати масу тіла

відповідно до віку, як при введенні ПЕарг, так і ПЕцис. Однак, об'єктом нашого інтересу була вага підшлункової залози щурів та, що важливіше, співвідношення між масою підшлункової залози і масою тіла.

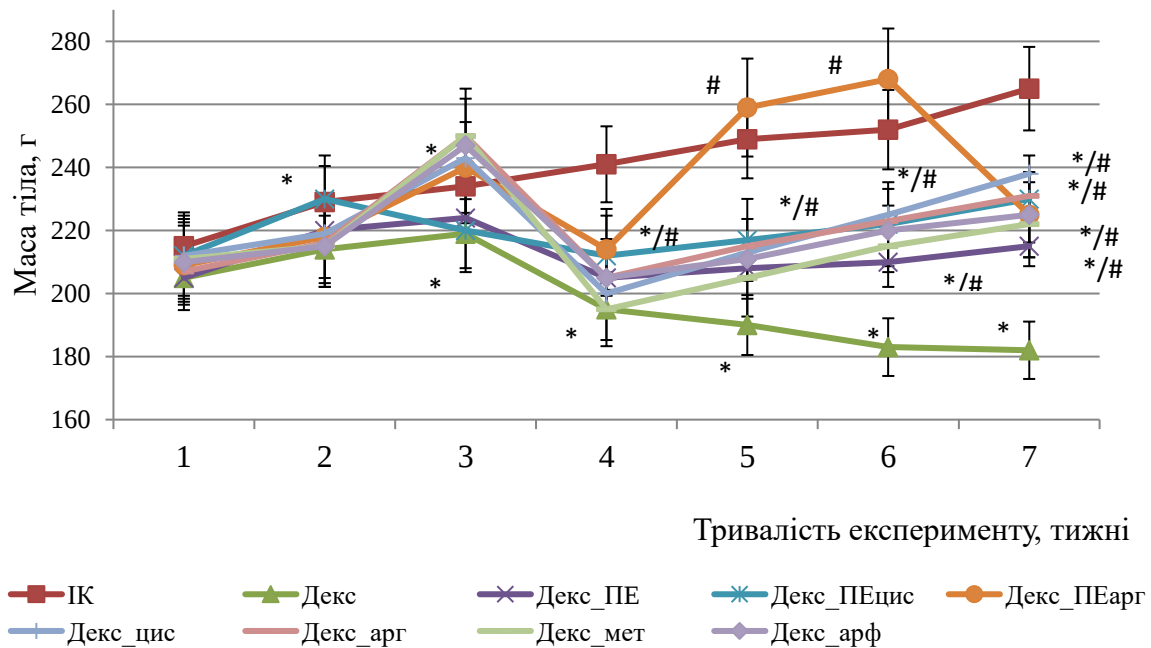


Рис. 5.2. Динаміка маси тіла при введенні ПЕарг та ПЕцис на тлі дексаметазон-індукованої ІР, грами (вісь ординат) за тижні (вісь абсцис)

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Як виявилось, абсолютна маса підшлункової залози в різних дослідних групах істотно варіювала, однозначно мала тенденцію до зменшення (рис. 5.3., а). Перерахунок відносної маси підшлункової залози показав, що цей показник у інтактних тварин вищий, ніж у щурів з контрольною патологією (група Декс). Після двотижневого введення нових отриманих екстрактів і референтних препаратів маса підшлункової залози зросла, але у тварин в усіх групах не досягла цього показника у здорових тварин (рис. 5.3., б). Зменшення ваги підшлункової залози можна пояснити не тільки руйнуванням і зникненням ПО та вибіркоvim руйнуванням клітин, що виробляють інсулін, але і ушкодженням її екзокринної частини.

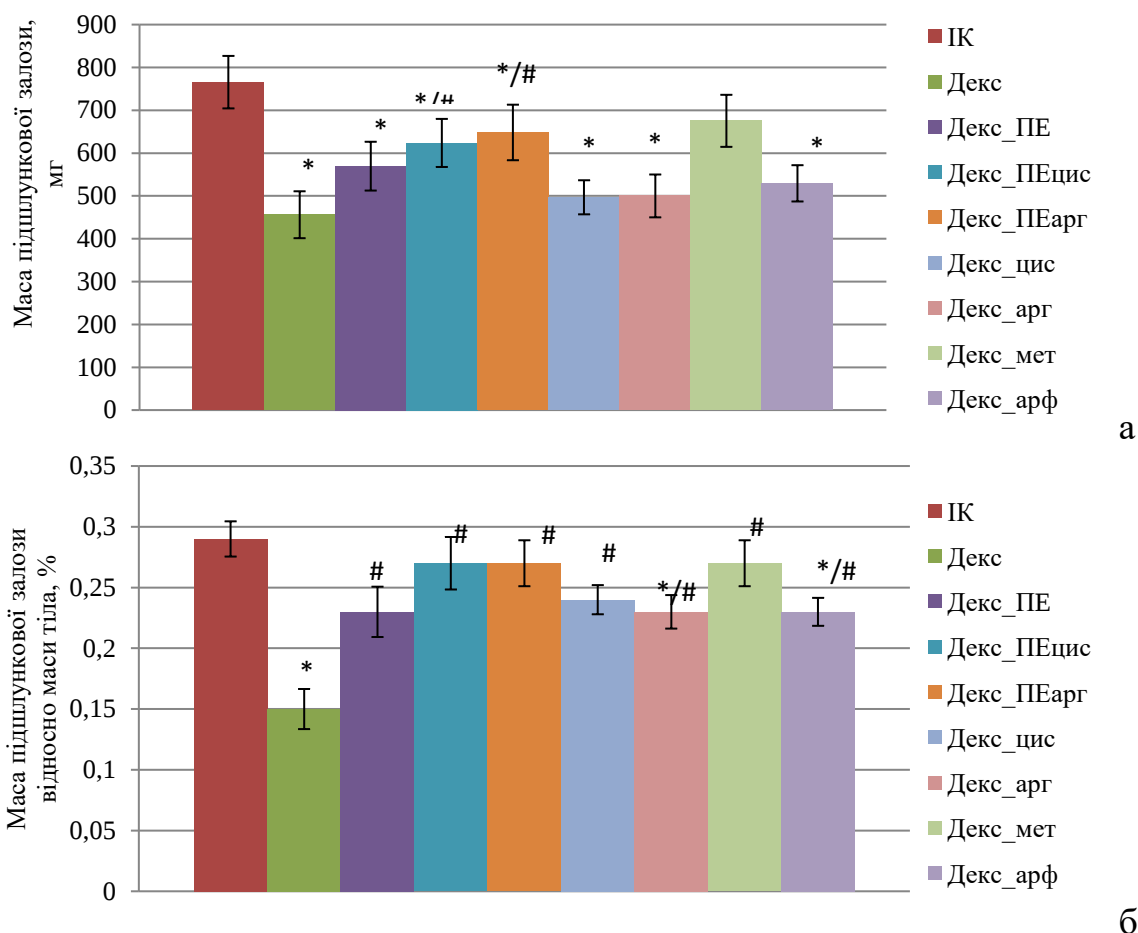


Рис. 5.3. Маса підшлункової залози при введенні ПЕарг та ПЕцис на тлі дексаметазон-індукованої ІР: а – маса підшлункової залози, грами; в – маса підшлункової залози відносно маси тіла, %

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

5.2.2 Дослідження оксидантно-антиоксидантного гомеостазу підшлункової залози

Після закінчення експерименту та вилучення органів, досліджувалися деякі показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в гомогенаті тканини ПЗ. Як показано в таблиці 5.2.1, гіперглікемічний стан, викликаний довгостроковими ін'єкціями дексаметазону, призводив до підвищення рівнів окислювальних

маркерів, таких як ТБК-АП та ДК, а також зниження активності антиоксидантних ферментів.

Розвиток експериментальної патології супроводжувався активацією процесів ПОЛ і виснаженням системи антиоксидантного захисту в клітинах ПЗ. Так, встановлено, що в гомогенатах тканини ПЗ тварин групи Декс вміст як первинних, так і кінцевих продуктів ПОЛ – ДК та ТБК-АП був підвищений у 1,97 та 1,49 рази відповідно. Рівень ГлВ знизився в 2,27 рази, що, очевидно, пов'язано з його використанням у процесі інактивації АФК, а також зниженням активності ГП. Встановлено, що в тканині ПЗ щурів групи Декс активність ферментів першої лінії антиоксидантного захисту – КАТ та СОД – зменшилася у 1,5 та 1,75 рази, відповідно (табл. 5.1.).

Таблиця 5.1.

Показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в гомогенаті ПЗ щурів за умов дексаметазон-індукованої ІР та при введенні ПЕцис та ПЕарг

Групи	Показники					
	ТБК-АП, нмоль/ мг білка	ДК, нмоль/ мг білка	ГлВ, нмоль/мг тканини	КАТ, μмоль/мг білка	СОД, ОД/мг білка	ГП, ОД/мг білка
ІК	99±11	47±7	82±7	0,54±0,03	28,3±1,7	0,68±0,06
Декс	148±21*	93±8*	36±6*	0,33±0,04*	16,1±0,9*	0,44±0,05*
Декс_ПЕ	112±14	64±4*/#	60±7	0,41±0,04*/#	21,3±1,5	0,51±0,07
Декс_ПЕцис	103±15#	59±6#	73±8*/#	0,51±0,05#	23,7±1,7#	0,63±0,03#
Декс_ПЕарг	105±8#	55±4#	75±6*/#	0,49±0,03	24,5±1,3#	0,64±0,07#
Декс_мет	114±12#	53±8#	70±6*/#	0,48±0,04#	24,6±1,4#	0,61±0,07#
Декс_арф	126±23	69±7*	56±7*/#	0,37±0,03*	22,3±1,7#	0,59±0,04

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Введення ПЕцис та ПЕарг тваринам з контрольною патологією пригнічувало процеси ПОЛ ліпідів і підсилювало антиоксидантний захист клітин ПЗ. Вміст ДК зменшився при введенні ПЕцис та ПЕарг в 1,57 і 1,69 разів та ТБК-АП зменшився у 1,44 рази та 1,41 рази, відповідно відносно групи Декс.

Вміст ГлВ під дією ПЕцис відновився майже до початкових значень, що, мабуть, було зумовлено не лише пригніченням оксидативного стресу, а й активацією ГП. Активності КАТ та СОД зросли в 1,5 та 1,43 рази порівняно з групою Декс (табл. 5.1.). Введення ПЕарг також мало позитивний вплив на стан антиоксидантної системи ПЗ підвищуючи рівень ГлВ та активність КАТ та СОД відповідно в 1,48 та 1,44 рази відповідно, що практично не відрізняється від впливу ПЕцис (табл. 5.1.).

Численні експериментальні дані підтверджують розвиток оксидативного стресу як одного з наслідків хронічної гіперглікемії [157]. Зокрема, експерименти як *in vivo*, так і *in vitro* з використанням культури бета-клітин ПЗ також надали докази збільшення продукції АФК [158]. У зв'язку з цим важливою є оцінка показників, які вказують на розвиток оксидативного стресу та відповідь системи антиоксидантного захисту клітин. Результати поточного експерименту, які виявили накопичення ТБК-АП і ДК в гомогенаті ПЗ, свідчать про інтенсифікацію утворення АФК. Взагалі, розвиток ІР у тварин групи Декс супроводжувався розвитком оксидативного стресу не тільки в підшлунковій залозі, але і в печінці щурів (див. Розділ 4), що збігається з даними літератури [159].

Введення тваринам ПЕцис та ПЕарг істотно пригнічувало ПОЛ та стимулювало активність ферментів антиоксидантного захисту (табл. 5.1.). Ефект, який ми спостерігали, по всій відомості, опосередковується спільною дією декількох компонентів. Так, пригнічення ПОЛ є результатом антиоксидантної активності поліфенольних компонентів, серед яких вираженою антиоксидантною активністю володіє арбутін [160], крім того, присутність галової кислоти та флавоноїдів пригнічує оксидативний стрес [161]. Підвищений рівень ГлВ може підтримуватися наявністю амінокислоти цистеїну, яка також

сприяє підвищенню активності ферментів, що містять SH-групи в активному центрі [162], що, в даному випадку, надає певної переваги ПЕцис над ПЕарг. Таким чином, поточні дослідження показують, що завдяки своїм антиоксидантним властивостям, введення ПЕцис та ПЕарг призвело до пригнічення оксидативного стресу зниження вмісту ТБК-АП та підвищення активності СОД та КАТ.

Важливо відзначити, що оксидативний стрес відіграє ключову роль у дисфункції бета-клітин і резистентності до інсуліну. Взагалі відомо, що пригнічення оксидативного стресу може бути показаною терапевтичною мішенню для лікування так званої «токсичності глюкози», яка виникає при цукровому діабеті [163].

5.2.3 Результати гістоморфометричних досліджень підшлункової залози за умов дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності та при введенні ПЕарг та ПЕцис

За результатами морфометрії оптична щільність ПО у щурів групи ІК дорівнювала 19,83, однак, ін'єкції дексаметазону істотно знижували цей показник. Так, оптична щільність ПО в групі Декс складала 16,50 (табл. 5.2.). Розміри ПО від великих до дрібних були розподілені у відсотках, і в групі Декс це співвідношення змінилося порівняно з тваринами ІК, що призвело до збільшення частки дрібних. Так, фіксувалося збільшення кількості дрібних (в 1,6 рази) та зменшення середніх (у 1,3 рази) островців (табл. 5.2.).

Функціональний індекс також значно знижується в групі Декс порівняно з ІК. Ситуацію покращує застосування ПЕцис та ПЕарг та референтних препаратів (табл. 5.2.).

На гістологічних препаратах ПЗ тварин групи Декс візуально спостерігалася поява поодиноких надвеликих за розміром ПО, однак, форма островців була переважно типовою.

Таблиця 5.2.

Морфометричні показники інкреторного апарату ПЗ щурів за умов дексаметазон-індукованої ІР та при введенні ПЕарг та ПЕцис

Групи	Оптична щільність	Розподіл панкреатичних островців за вмістом бета-клітин						Функціональний індекс
		дрібні		середні		великі		
		п	%	п	%	п	%	
ІК	19,83± 0,715	4,30± 0,81	21,77± 2,31	1,33± 0,82	67,16± 2,85	2,1± 0,75	10,83± 2,04	4,83± 0,41
Декс	16,50± 0,564*	5,83± 0,75*	35,35± 4,75*	8,33± 1,03*	50,61± 6,94*	2,33± 1,21	13,81± 4,91	2,73± 0,44*
Декс_ПЕ	17,72± 0,54#	5,79± 0,48	34,33± 1,54*	8,83± 1,32*	51,85± 6,17*	2,16± 0,75	13,82± 3,14	3,01± 0,12
Декс_ПЕарг	18,16± 0,42#	4,24 ±0,32#	25,71± 1,43#	10,00± 1,29*	60,53± 4,48	2,24± 0,58	13,75± 2,07	3,15± 0,11
Декс_ПЕцис	18,33± 0,51#	4,67± 0,51#	22,43± 2,62#	11,16± 0,98*	60,91± 5,19	2,66± 0,51	14,52± 2,87	3,26± 0,53
Декс_Арф	17,33± 1,03	5,83± 0,40*	33,67± 1,21*	9,33± 0,81	53,87± 3,86*	2,16± 0,98	12,45± 5,24	2,93± 0,39
Декс_Мет	18,66± 0,81#	4,66± 0,50#	24,97± 2,19#	11,50± 0,54	61,65± 3,07#	2,50± 0,83	13,36± 4,50	3,74± 0,38

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Візуально на тлі доволі численних гістологічно незмінених ПО у цілій низці островців простежена гіпертрофія та ознаки деструкції ядер, вакуолізація цитоплазми бета-клітин. Спостерігали варіабельну за виразністю спустошеність центральної зони ПО. У окремих островцях видно не дуже виразну гніздову проліферацію альфа-клітин у місцях типової локалізації їх у інтактних щурів (рис. 5.4.).

У екзокринній складовій залозистої тканини у деяких щурів виявлено вогнищеву вакуолізацію панкреатитів, поодинокі периваскулярні гістіо-лімфоцитарні інфільтрати. Вивідні протоки усіх калібрів дещо поширено, достатньо чітко простежена проліферація епітелію протоків (рис. 5.5.).

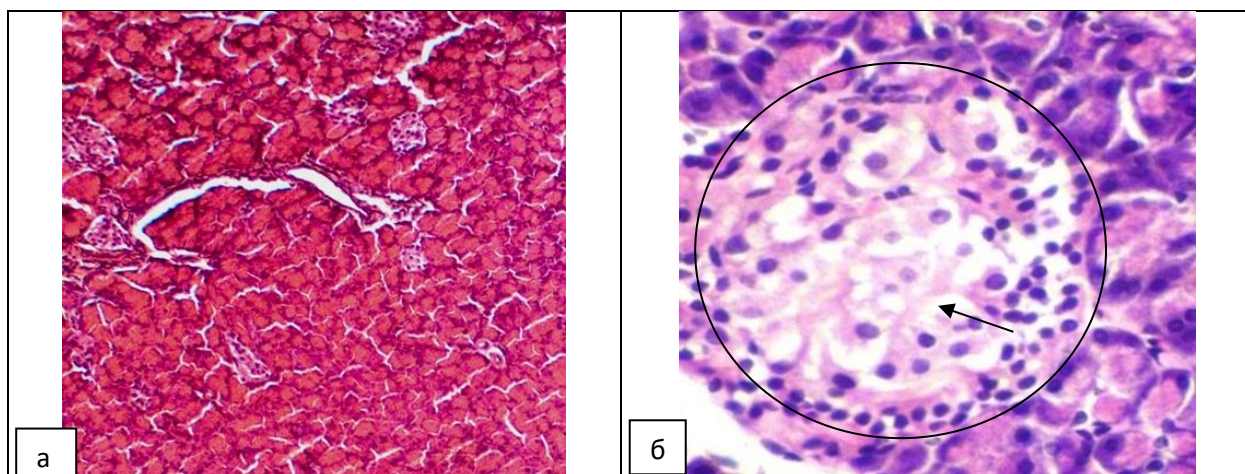


Рис. 5.4. Підшлункова залоза щура з ІР (група Декс): а – збільшення численності дрібних за розміром ПО (x100); б – вакуолізація цитоплазми, гіпертрофія/деструкція частини ядер бета-клітин, проліферація альфа-клітин (стрілка) (x250). Гематоксилін-еозин.

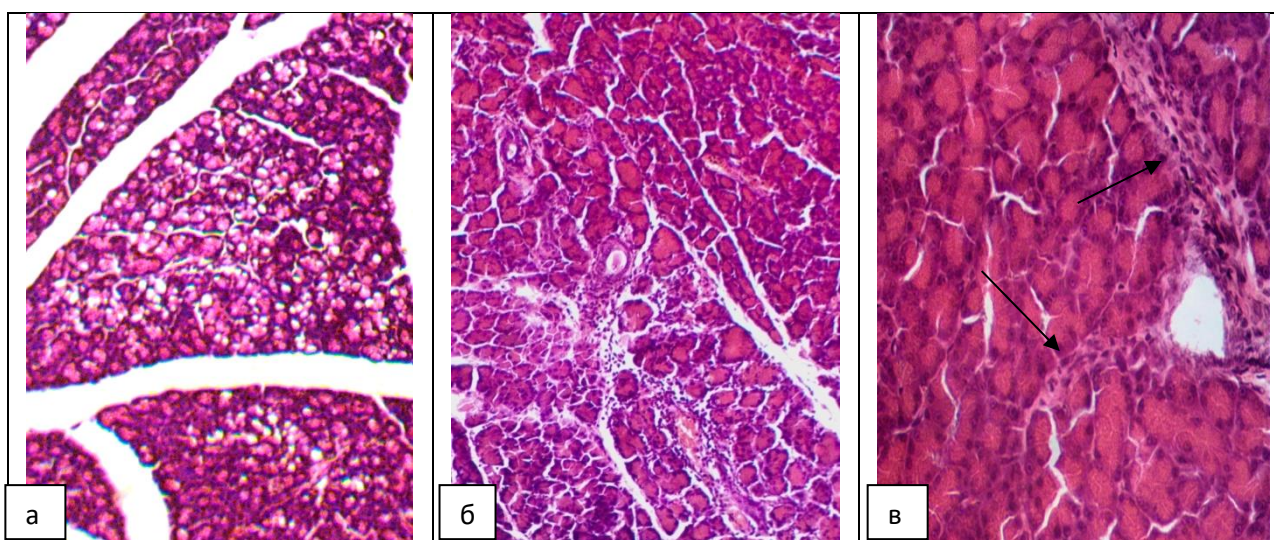


Рис. 5.5. Підшлункова залоза щура з ІР (група Декс): а – вакуолізація цитоплазми панкреацитів; б – вогнищева міжацинарна та периваскулярна круглоклітинна інфільтрація; в – проліферація протокового епітелію. Гематоксилін-еозин. x100.

Отже, розвиток дексаметазон-індукованої дієти призвів до виникнення в ПЗ морфологічних ознак певної пригніченості інсулярного апарату. Насамперед це проявилось у підвищенні чисельності дрібних ПО. Можна припустити, що при цьому сумарна кількість бета-клітин у ПО знижується, а ті, що залишилися, не в змозі забезпечити потребу організму у інсуліні, тому частина бета-клітин

працює у посиленому режимі. Морфологічно це проявилось у їхній гіпертрофії, дистрофії, що через деякий час може призвести до виснаження таких бета-клітин і, згодом – до їхньої загибелі, що виражалось в різному ступені руйнування інсулінпродукуючих клітин ПО [164]. А це вже може призвести до різного ступеню спустошеності інсуліноцитів у ПО. Такі морфологічні ознаки є характерними для картини ІР та ЦД2 [165].

Збільшення частки малих острівців, з нашої точки зору, відображає реакцію організму на атрофію ПО і, в той же час, свідчить про певні адаптаційні процеси, включаючи навіть трансформацію клітин ацинарного епітелію, або епітелію протоків, які ведуть в острівцеві. Гіпертрофія острівців також, ймовірно, відображає компенсаторно-приспосувальну реакцію інсулярного апарату на перенапруження. Такі острівці містили в основному клітини з малими ядрами і невеликим об'ємом цитоплазми і, можливо, не були функціонально повноцінними [166].

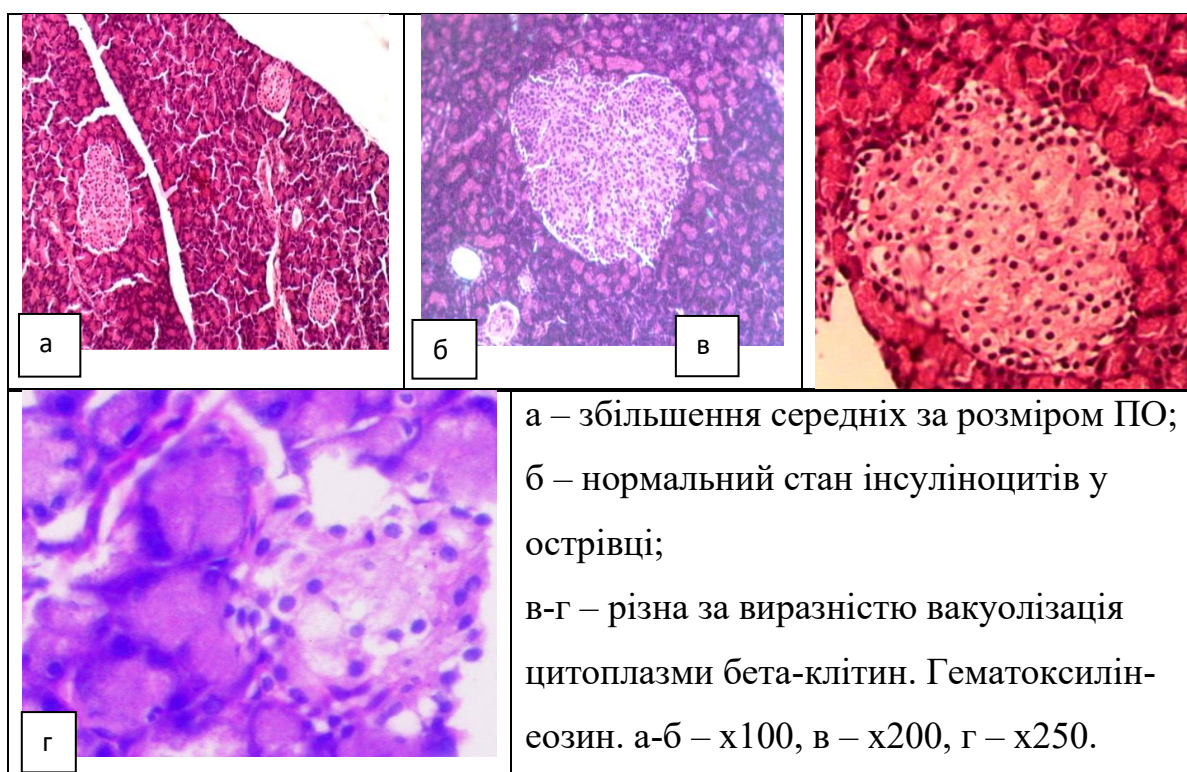


Рис. 5.6. Підшлункова залоза щура з ІР, індукованою дексаметазоном, після введення екстракту ПЕ₅₀ (група Декс_ПЕ)

Виходячи з результатів гістологічного дослідження, можна відмітити подібність візуальної картини препаратів ПЗ після двотижневого введення ПЕ₅₀ і препарату порівняння збору «Арфазетин» щурам за умов ІР. Так, у значно більшій кількості мікропрепаратів ПО були без дистрофічних та деструктивних змін, хоча деякі островці все ж мали ці ознаки (рис. 5.6., рис. 5.7.). Насправді великих островців не спостерігалось. Змін у ацинозній тканині не виявили. Зафіксовано позитивний вплив цих комбінацій на інкреторний апарат при лікуванні щурів порівняно з контрольною патологією (група Декс). При цьому, було зареєстроване помірне збільшення як оптичної щільності ПО, так і оновлення розподілу островців за розмірами порівняно з контрольною патологією – приблизно на 5-6% (табл. 5.3.).

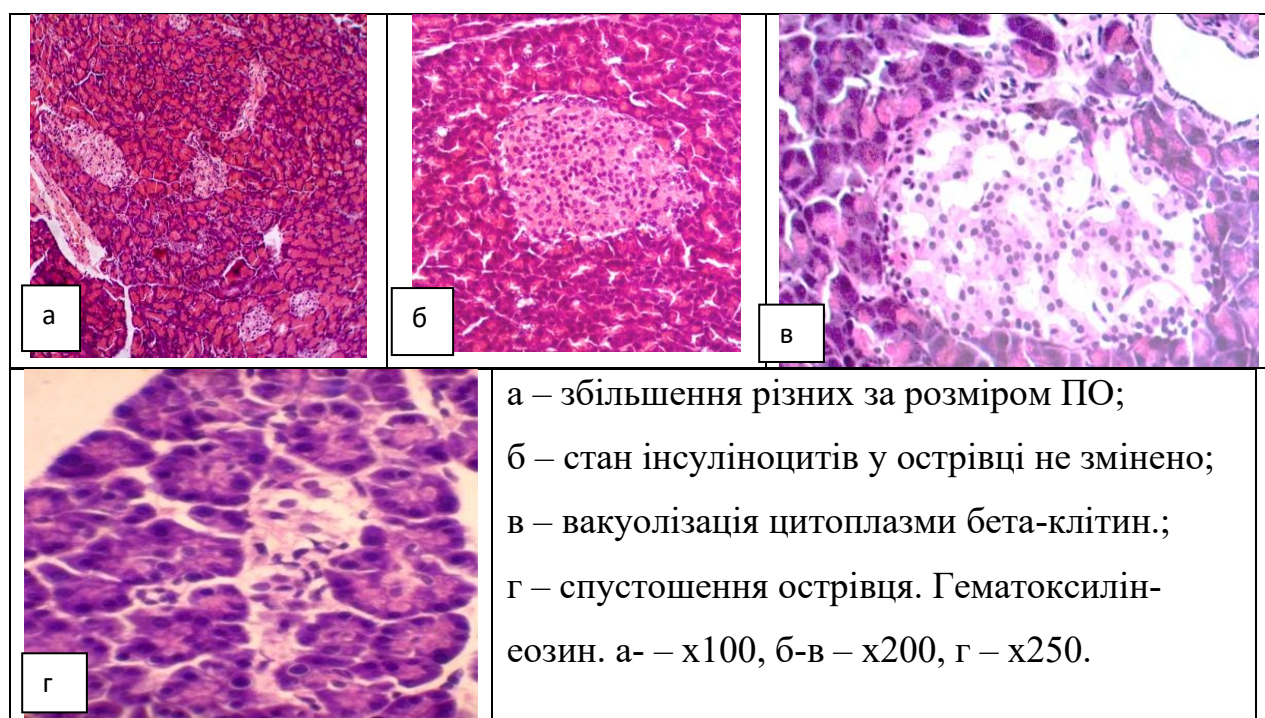


Рис. 5.7. Підшлункова залоза щура з ІР, індукованою дексаметазоном, після введення збору «Арфазетин» (група Декс_Арф)

Однак, введення ПЕдис, ПЕарг та референт-препарату метформіну оказували більш виражений ефект на тканини та клітини ПЗ, впливаючи позитивно на ендокринний компонент залозистої тканини. Більша частина ПО

мала типову форму, рівномірно заповнену фізично фізіологічно нормальними бета-клітинами.

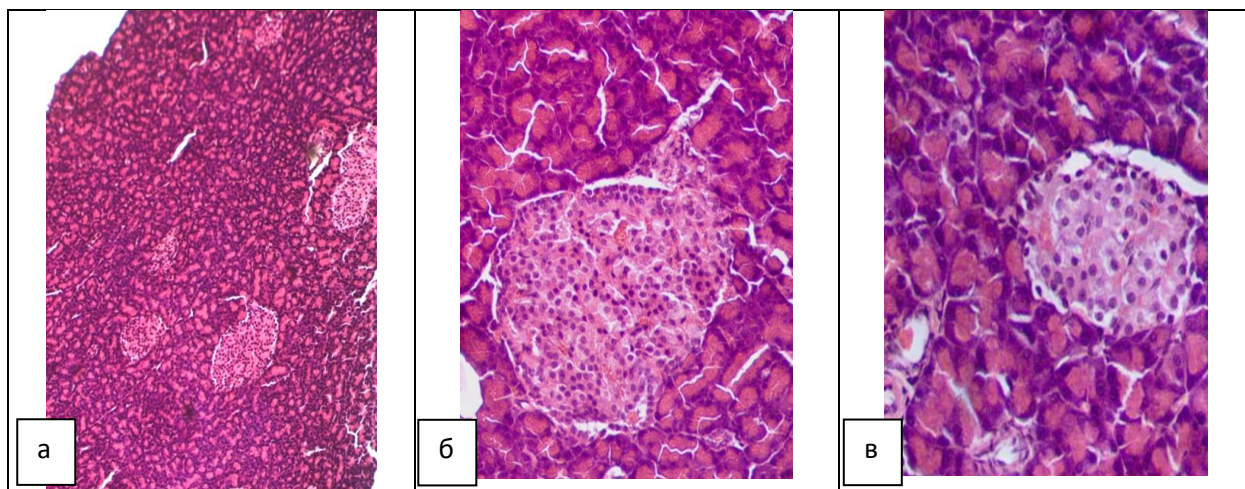


Рис. 5.8. Підшлункова залоза щура з ІР, індукованою дексаметазоном, після введення метформіну (група Декс_мет): візуальне відновлення чисельності островків (а, x100), функціонального стану інсуліноцитів (б, x200), деяка гіпертрофія ядер та вакуолізація цитоплазми бета-клітин (в, 250). Гематоксилін-еозин.

Помітної проліферації альфа-клітин не спостерігалось. Лише на рідкісних острівцях були виявлені вакуолізовані бета-клітини та центральні зони девастації (рис. 5.8., рис. 5.9.). У деяких щурів у ацинарній тканині спостерігається вогнищева периваскулярна та міжацинарна лімфоцитарна інфільтрація.

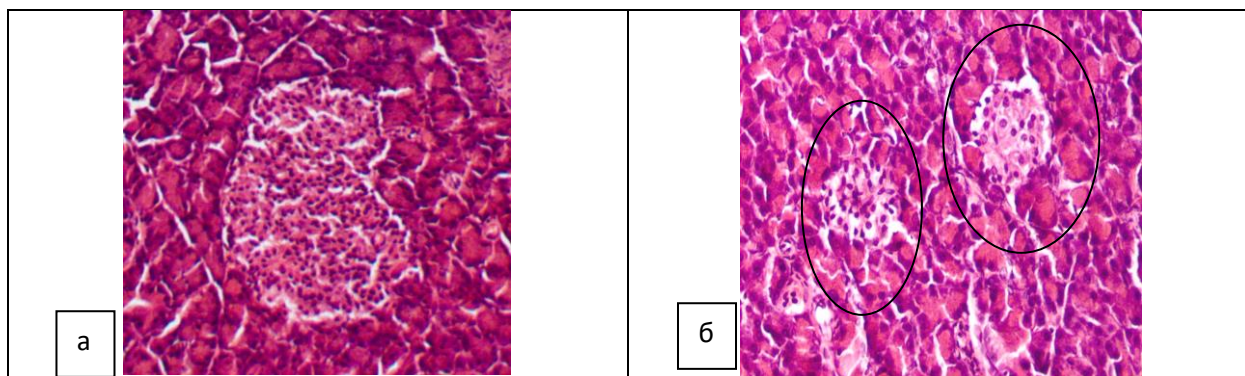


Рис. 5.9. Підшлункова залоза щура з ІР, індукованою дексаметазоном, після введення ПЕцис (група Декс_ПЕцис): а – незмінений ПО; б – вакуолізація бета-клітин і деяке спустошення острівця. Гематоксилін-еозин. x200.

Введення ПЕарг за умов дексаметазон-індукованої дієти (група Декс_ПЕарг) при візуальному дослідженні гістологічних препаратів продемонструвало досить виразне відновлення тканини ПЗ, яка була ушкоджена станом ІР. У інсулярній тканині були менш показові деструктивно-дистрофічні прояви, візуалізувалося збільшення морфологічно більш повноцінних інсуліноцитів (рис. 5.10., рис. 5.11.). В певній мірі відновився кількісний вміст панкреатичних острівців, наповненість їх бета-клітинами та нормальний відсотковий розподіл їх за розміром (табл. 5.3.).

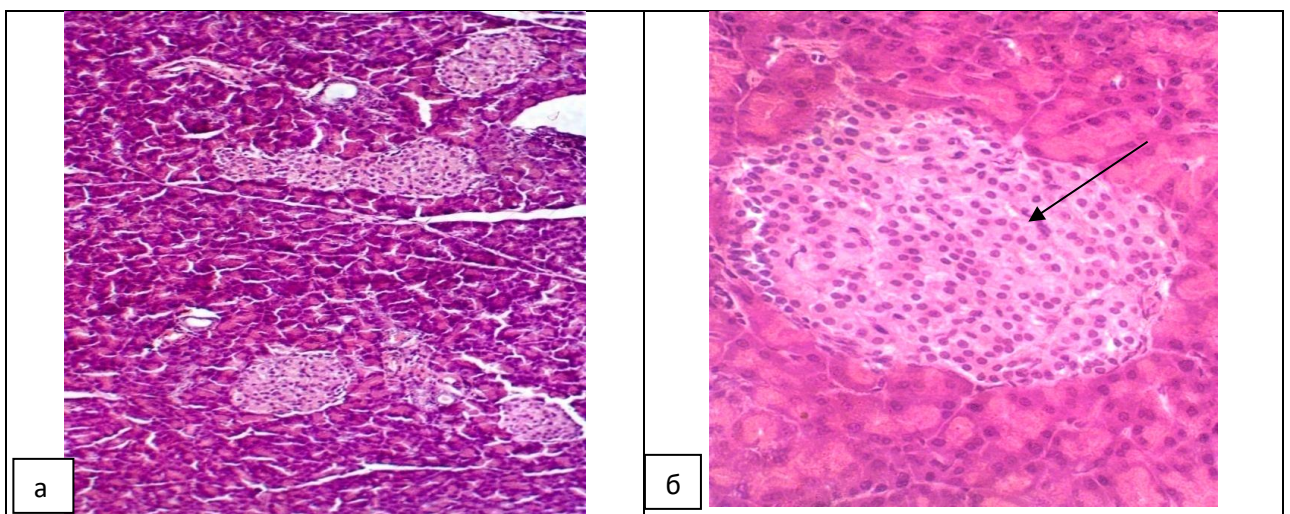


Рис. 5.10. Підшлункова залоза щура з ІР, індукованою дексаметазоном, після введення ПЕарг (група Декс_ПЕарг): а – зменшення дрібних, збільшення середніх за розміром ПО (x100); б – гістологічно нормальний стан бета- і альфа-клітин острівця (x200). Гематоксилін-еозин.

На підставі отриманих гістологічних даних можна зробити підсумок, що моделювання ІР шляхом введення щоденних низьких доз дексаметазону протягом 7 тижнів призвело до розвитку морфологічних ознак певної депресії інсулярного апарату. При проведенні порівняння результатів гістологічних досліджень ПЗ щурів групи Декс і ПЗ щурів груп Декс_ПЕ та Декс_ПЕдис, Декс_ПЕарг та референс-препаратів, були помітні досить значні розбіжності розташування острівцевих клітин у щурів. Введення ПЕдис та ПЕарг сприяло певному пригніченню впливу метаболічних порушень, які викликані станом ІР,

на секреторний апарат. В острівцях Лангерганса менш виражені деструктивно-дистрофічні прояви, помітно збільшення морфологічно більш здорових бета-клітин. Відновився кількісний склад панкреатичних острівців та їхня наповненість бета-клітинами. Ефективність застосування ПЕцис та ПЕарг щодо оздоровлення ендокринної тканини була дещо менша, ніж після прийому метформіну, однак виглядала краще порівняно з іншим референтним препаратом – збором «Афазетин».

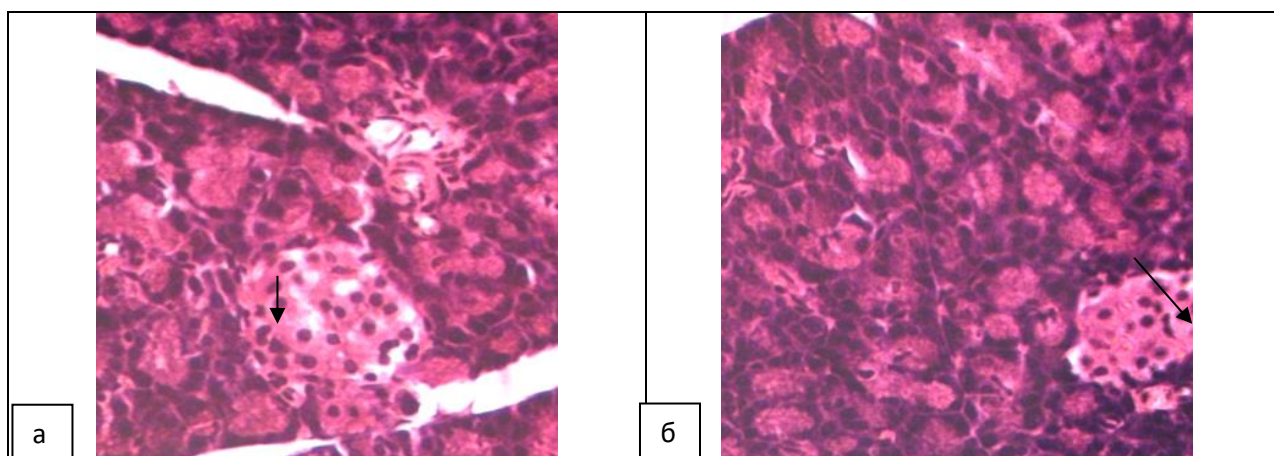


Рис. 5.11. Підшлункова залоза щура з ІР, індукованою дексаметазоном, після введення ПЕарг (група Декс_ПЕарг): а – вакуолізація бета-клітин; б – нерівномірне клітинне спустошення острівців. Гематоксилін-еозин. x250.

На морфологічний стан ендокринного апарату залозистої тканини щурів у цій моделі патології лікування ПЕ₅₀ мало менш показовий терапевтичний ефект, ніж його комбінація з амінокислотами.

5.3. Морфофункціональні дослідження підшлункової залози за умов інсулінорезистентності, яка викликана високофруктозною дієтою та при введенні ПЕарг та ПЕцис

З високим споживанням фруктози, яке призводить до системної ІР, пов'язане підвищення рівня циркулюючих ліпідів, що призводить до ліпотоксичності. Наслідком ліпотоксичності є дисфункція бета-клітин острівців

підшлункової залози. Таким чином, індукований фруктозою синтез жирних кислот (особливо пальмітату) може вплинути на секрецію інсуліну через порушення функції бета-клітин острівців підшлункової залози, що є ще одним негативним наслідком ВФД [167].

5.3.1 Вивчення динаміки змін маси тіла щурів та відносна маса підшлункової залози за умов інсулінорезистентності, яка викликана високофруктозною дієтою

На рис. 5.12. розміщена діаграма, яка відображає динаміку маси тіла щурів в експериментальних групах. ВФД однозначно призводила до збільшення маси тіла тварин, що, безумовно було зумовлене наслідками присутності великої кількості фруктози в дієті, такими, як збільшення споживання калорій, стимуляція синтезу тригліцеридів, підвищений апатит та ін.

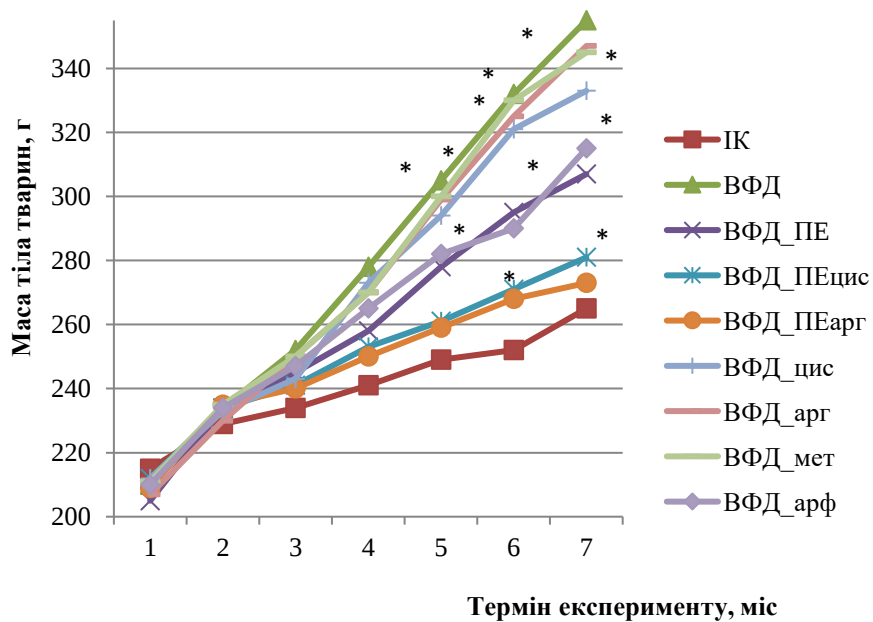


Рис. 5.12. Динаміка маси тіла при введенні ПЕарг та ПЕцис на тлі ІР індукованої ВФД, грами (вісь ординат) за тижні (вісь абсцис).

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

При введенні досліджуваних екстрактів і референс-препаратів динаміка зростання маси тіла сповільнювалася порівняно з тваринами з ВДФ групи (рис. 5.12.). Звісно, треба приймати до уваги, що був присутній природний приріст маси тіла. Ендокринна частина ПЗ є пластичною тканиною і бета-клітинна маса є динамічною, особливо через її значну здатність адаптуватися до змін рівня інсуліну [168]. Однак, стан ІР та ожиріння, що розвивається впливають і на екзокринну частину, включаючи строму, та можуть викликати дегенеративні зміни. В нашому експерименті ІР, яка індукована ВДФ призвела до зменшення маси ПЗ у тварин групи контрольної патології. Введення ПЕцис та ПЕарг сприяло відновленню маси ПЗ.

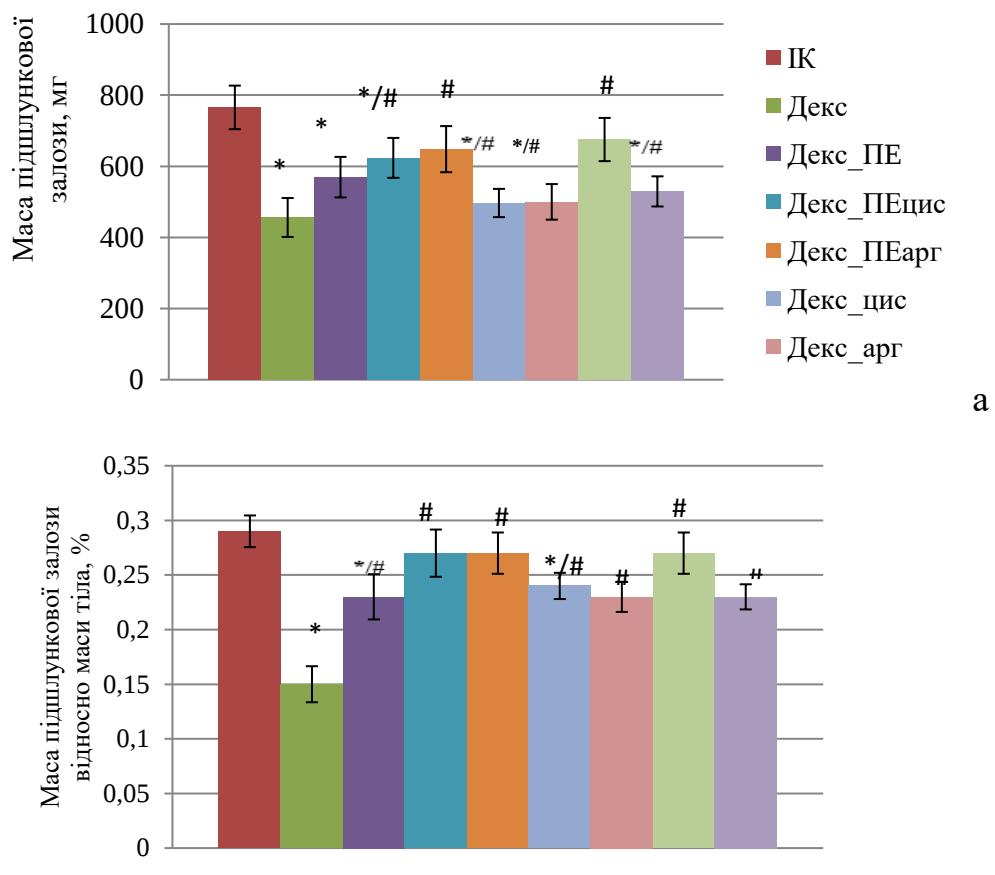


Рисунок 5.13. Маса підшлункової залози при введенні ПЕарг та ПЕцис на тлі ІР, яка індукована ВДФ: а – маса підшлункової залози, грами; в – маса підшлункової залози відносно маси тіла, %.

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

5.3.2 Дослідження оксидантно-антиоксидантного гомеостазу підшлункової залози

Клітини ПЗ дуже чутливі до оксидативного стресу, тому що накопичення АФК може призвести до ушкодження клітин як ендокринної, так і екзокринної її частини. Тому для нас важливо було дослідити, як ВФД впливає на оксидантно-антиоксидантного гомеостаз ПЗ щурів, та як введення досліджуваних екстрактів може вплинути стан антиоксидантної системи.

Таблиця 5.3.

Показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в гомогенаті ПЗ щурів за умов дексаметазон-індукованої ІР та при введенні ПЕцис та ПЕарг

Групи	Показники					
	ТБК-АП, нмоль/мг білка	ДК, нмоль/мг білка	ГлВ, нмоль/ мг тканини	КАТ, μмоль/мг білка	СОД, ОД/мг білка	ГП, ОД/мг білка
ІК	108±11	53±6	103±11	0,86±0,09	31,4±1,4	0,83±0,06
ВФД	211±27*	105±8*	67±9*	0,54±0,06*	19,1±1,1*	0,59±0,05*
ВФД_ПЕ	153±19	81±9*/#	89±7	0,67±0,05* /#	25,3±1,6	0,69±0,07
ВФД_ПЕ цис	124±18#	73±11	91±8*/#	0,73±0,07#	28,7±1,7#	0,75±0,08#
ВФД_ПЕ арг	129±22*/ #	78±9*/#	85±6#	0,69±0,07#	27,6±1,3* /#	0,73±0,06#
ВФД_мет	154±12#	90±12#	79±6*/#	0,63±0,05#	26,9±1,5	0,66±0,09
ВФД_арф	169±19	84±8*	86±7	0,68±0,07*	24,9±1,6	0,67±0,05

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІС ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

Для цього визначали показники, які характеризують оксидативний стрес в тканинах ПЗ. Порівняно зі здоровими тваринами (ІК група), у гомогенатах ПЗ щурів групи ВДФ було продемонстровано підвищений вміст ТБК-АП та ДК на 48,8% та 49,5%, відповідно. На розвиток оксидативного стресу в ПЗ також

вказували знижений рівень ГлВ та достовірне зниження активність ферментів антиоксидантного захисту у щурів, які дотримувалися ВФД (табл. 5.3.).

Введення ПЕцис та Пеарг, а також референс-препарату метформіну змінило ці значення майже до нормальних у щурів з діабетом.

Таким чином, застосування ПЕ₅₀, ПЕцис та Пеарг запобігало розвитку оксидативного стресу, навіть перевищуючи за деякими показниками препарати порівняння збір «Арфазетин» та метформін. Однак, найбільший антиоксидантний ефект виявлено у ПЕцис.

5.3.3 Результати гістоморфометричних досліджень підшлункової залози за умов інсулінорезистентності, яка індукована високофруктозною дієтою та при введенні Пеарг та ПЕцис

Для оцінки пошкодження бета-клітин ПЗ за умов ВФД були проведені морфофункціональні дослідження. Після тривалого навантаження фруктозою у щурів групи контрольної патології (ВФД) чисельність ПО у часточках ПЗ не змінилася відносно ІК групи, але змінився відсотковий розподіл різних за розміром островців: частка середніх островців зменшена на 42,7%, дрібних – збільшена у 1,9 рази, великих – збільшена на 79,3% (табл. 5.4.). Серед дрібних ПО візуально було відмічене збільшення наявності островців, які містили не більше 4-6 клітин, а також появу великих «розпластаних» островців, які немов би «розтікалася» у ширину або довжину. Між собою такі «розпластани» сегменти островця розділялися дуже скудними прошарками сполучної тканини або одним шаром ацинусів (рис. 5.14., а-б). Гістологічно значна частина островців містила візуально нормальні у функціональному стані бета-клітини.

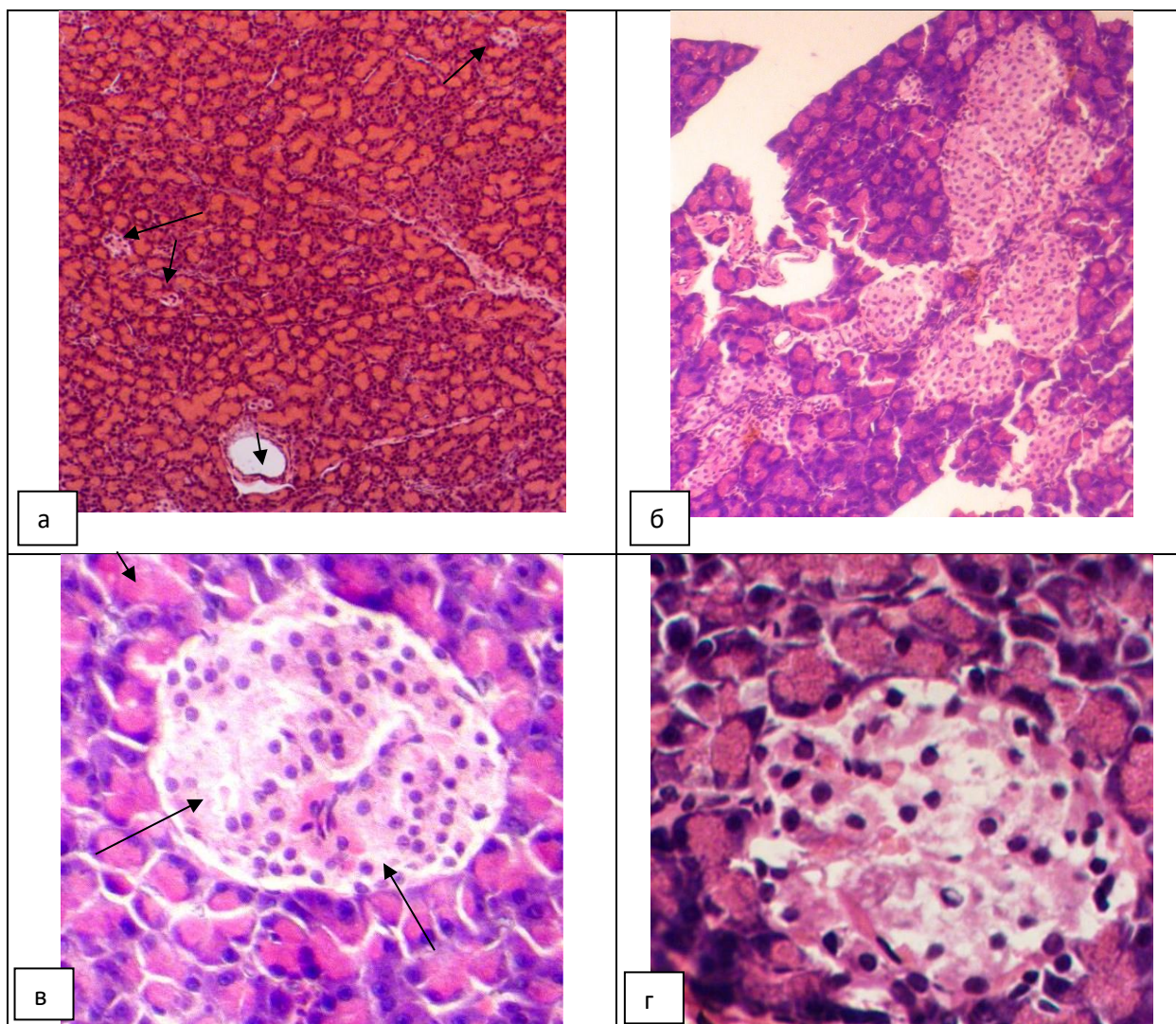


Рис. 5.14. Підшлункова залоза щура з ІР, яка індукована ВДФ (група ВДФ): а – виразне збільшення дуже дрібних ПО; б – «розгалужений» на різні сегменти великий ПО. (x100). Різна за виразністю спустошеність бета-клітин у острівці: в – гніздова (x250); г – розповсюджена (x200). Гематоксилін-еозин.

У відносно невеликій частки ПО спостерігали явні ознаки «функціональної напруги»: серед зорово нормальних бета-клітин простежено клітини з гіпертрофією ядр (функціонально надмірно навантажені) та клітини з нечіткими блідими ядрами (можливо на якийсь стадії лізису); в деяких острівцях спостерігається різного ступеню виразності гніздова спустошеність центральних зон, не виразна вакуолізація цитоплазми бета-клітин. У поодиноких острівцях спостерігали проліферацію альфа-клітин. Зовнішньосекреторна паренхіма залози гістологічно нормальна. Функціональний стан ацинозних клітин досить

стабільний. У ацинарній паренхімі деяких щурів помічена периваскулярна та міжацинарна круглоклітинна інфільтрація (рис.5.14., в-г).

Таблиця 5.4.

Морфометричні показники інкреторного апарату ПЗ у щурів з ІР, яка індукована ВФД та через 2 тижні введення ПЕарг та ПЕцис

Групи	Оптична щільність	Розподіл панкреатичних острівців за вмістом бета-клітин						Функціональний індекс
		дрібні		середні		великі		
		п	%	п	%	п	%	
ІК	19,83± 0,71	4,30± 0,81	21,77± 2,31	13,33± 0,82	67,16± 2,85	2,1± 0,75	10,83± 2,04	4,83± 0,41
ВФД	19,51± 0,68	8,15± 0,93*	41,78± 4,11*	7,14± 6,55*	38,54± 1,53*	3,84± 0,45*	19,67± 0,86*	2,21± 0,26*
ВФД_ПЕ	19,33± 0,34	7,14± 0,84*	36,93± 3,32	9,35± 0,98	48,37± 2,75	2,84± 0,25	14,69± 1,11	3,01± 0,21
ВФД_ПЕарг	20,21± 0,81	6,19± 0,56*	30,64± 3,78*/ #	11,39± 1,54#	56,38± 3,84*/ #	2,62± 0,19	12,96± 0,96	4,25± 0,35
ВФД_ПЕцис	19,53± 0,74	7,01± 0,72	35,85± 3,65	10,03± 0,99#	51,36± 3,25*/ #	2,49± 0,21	12,78± 1,06	4,31± 0,31
ВФД_Арф	19,05± 0,52	6,05± 0,65*/#	31,73± 2,68*/ #	10,22± 1,93#	53,65± 4,21*/ #	2,81± 0,17	14,76± 1,98	2,76± 0,19
ВФД_Мет	20,04± 0,63	5,83± 0,73#	29,08± 2,41*/ #	11,69± 1,23#	58,38± 1,58#	2,51± 0,26	12,52± 1,15	4,13± 0,29

Примітки:

* – вказує на достовірну різницю відносно групи ІК ($p \leq 0,05$)

– вказує на достовірну різницю відносно групи Декс ($p \leq 0,05$)

На гістологічних зрізах в групах тварин, яким на тлі ІР вводили ПЕ₅₀, ПЕцис та ПЕарг, при візуальному обстеженні простежено збільшення середніх та зменшення дрібних острівців (рис. 5.3.4). Це підтверджується і даними морфометрії: відсоткова частка дрібних ПО становила на 7,4% (група ВФД_ПЕ), 14,2% (ВФД_ПЕцис) та 26,66% (ВФД_ПЕарг) менше чим в групі контрольної патології (ВФД), а середніх – на 25,5%, 33,26% і 46,3% відповідно. Частка

великих ПО скоротилася на 34-35% під впливом цих поліфенольних екстрактів, при цьому «розпластаних» ПО майже не спостерігали. У острівцях на всіх мікропрепаратах в цілому візуально менш помітні дистрофічно-деструктивні зміни бета-клітин, розрідженість у розташуванні інсуліноцитів центральних зон (більш наглядно після введення ПЕарг), хоча в деяких островках ці зміни були практично на рівні контрольної патології (рис. 5.15).

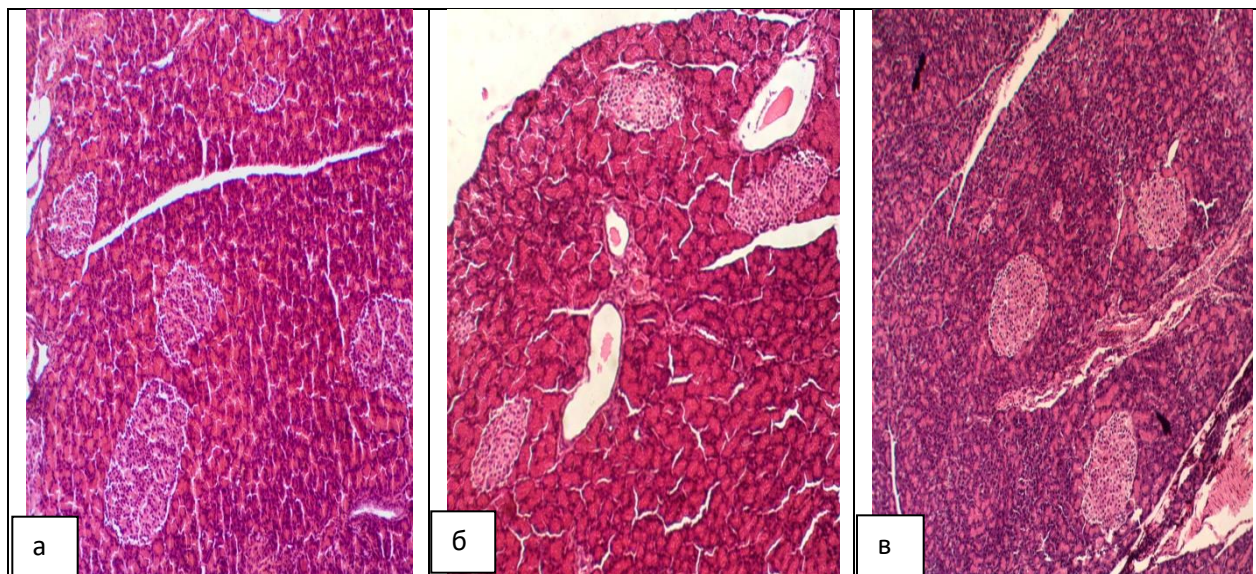


Рисунок 5.15. Підшлункова залоза щурів після введення ПЕарг (а), ПЕцис (б) та ПЕ₅₀ (в) на тлі ІР, яка індукована ВФД (групи ВДФ_ПЕарг (а), ВДФ_ПЕцис (б) та ВДФ_ПЕ (в). Збільшення середніх та зменшення дрібних панкреатичних островків. Гематоксилін-еозин. x100.

У щурів групи ВДФ_ПЕарг відмічено позитивний вплив введення ПЕарг на ендокринну складову залозистої тканини. Цей вплив як візуально, так і морфометрично був достатньо показовим не тільки проти контрольної патології (група Декс), а і порівняно з таким після курсу введення ПЕ₅₀ чи відвару збору «Арфазетин» (табл. 5.4.). Гістологічно будова основної маси панкреатичних островків (насиченість бета-клітинами, рівномірність розподілу, функціональний стан), форма їх, чіткість відмежування від оточуючої ацинарної тканини не мінялися порівняно з інтактними тваринами (рис. 5.16., а-а¹), хоча і мали місце островки з спустошенням та вакуолізацією бета-клітин. Помітної

проліферації альфа-клітин у островках не спостерігали. Візуальних змін у стані екзокринної складової залозистої тканини не помічено.

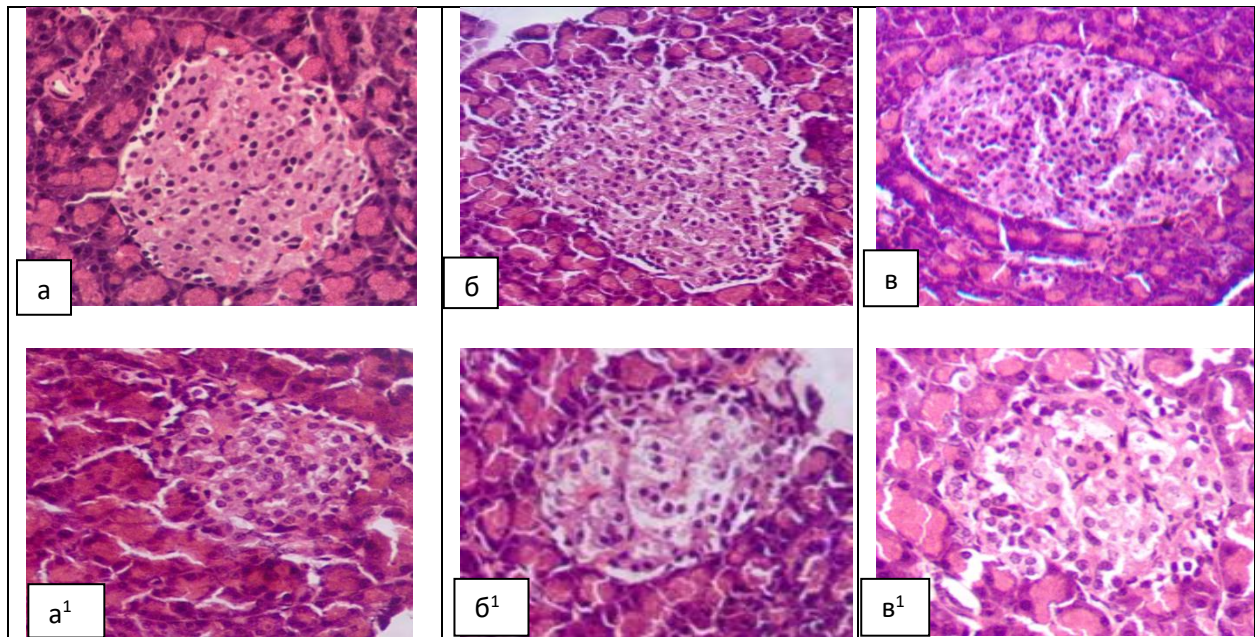


Рис. 5.16. Підшлункова залоза щурів після введення ПЕарг (а, а¹), ПЕцис (б, б¹), ПЕ₅₀ (в, в¹) на тлі ІР, яка індукована ВФД (групи ВДФ_ПЕарг (а, а¹), ВДФ_ПЕцис (б, б¹) та ВДФ_ПЕ (в, в¹): нормальний стан бета-клітин панкреатичних островків (а, б, в); різного ступеню дистрофічні зміни бета-клітин островків (а¹, б¹, в¹). Гематоксилін-еозин. а- в - х100, а¹- в¹ – х200.

Після введення препаратів порівняння метформіну та збору «Арфазетин» оптична щільність ПО залишалася стабільною. Чітко простежено (більш виразне після введення метформіну) відносно показове відновлення відсоткових часток різних за розміром ПО порівняно з контрольною патологією (табл. 5.4.). Морфологічний стан інсулярного апарату переважної більшості ПО був без помітних патологічних змін. Бета-клітини крупні, з соковитими ядрами, достатньо великим об'ємом цитоплазми. Рівномірний розподіл їх по островку типовий. Лише відносно невелика частка островків спустошена (в основному частково), містила бета-клітини з ознаками патологічних змін (рис. 5.17.).

Отже, отримані гістологічні результати свідчать, що тривале надходження надлишку фруктози призводить до певної активації компенсаторно-адаптивних

змін інсулярного апарату щурів (гіпертрофія ядер частини бета-клітин) та провокує виникнення дистрофічно-деструктивних змін інсуліноцитів в низці панкреатичних островців, спустошення деяких островців (очевидно, в наслідок виснаження їх від надмірного функціонування). Збільшення частки дрібних островців, поява «розпластаних» великих островців, на наш погляд, також має компенсаторний характер, є намаганням органу якимось чином відновити знижену у результаті цієї пригніченості сумарну кількість «працюючих» бета-клітин. За даними літератури подібна гістологічна картина відображає розвиток так званого, «діабетогенного» стану або переддіабету [169].

ПЕарг та ПЕцис оказують певний захисний ефект стосовно розвитку змін, що були наслідком ІР у щурів, які отримували ВФД. Морфологічно це проявляється у зменшенні деструктивно-дистрофічно змінених та збільшенні функціонально повноцінних інсуліноцитів, і, як наслідок, відновленні (в тому чи іншому ступеню) нормального розподілу панкреатичних островків за розміром.

При порівнянні панкреопротекторної дії досліджених екстрактів певну перевагу має модифікація ПЕ50 з аргініном. ПЕарг оказує ефект, більш потужний з впливом препарату порівняння фітозбору «Арфазетин», та трохи поступається дії іншого референтного препарату – метформіну.

Характерними особливостями морфології островців при резистентності до інсуліну та явному діабеті є гіпертрофія/гіперплазія та дегенерація відповідно [170]. ІР, що розвивається, може спричинити загибель клітин ПЗ через генерацію АФК, пошкодження ДНК, активацію ферменту полі (АДФ-рібо) полімерази (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) і виснаження NAD⁺ [171], що є одним з пояснень ушкодження тканин ПЗ, яке ми спостерігали в цьому дослідженні. Індикатори активації ПОЛ були підвищені в гомогенаті ПЗ разом із численними гістопатологічними змінами, включаючи гіпертрофію та гіперплазію, що відбуваються внаслідок пошкодження ПЗ, спричиненого хронічною гіперглікемією, опосередкованою окислювальним стресом і вірогідним запаленням. Корисні ефекти ПЕцис та ПЕарг, в числі інших, можуть бути пов'язані із антиоксидантними властивостями враховуючи те, що хронічна

гіперглікемія провокує надмірне виробництво АФК у ПЗ, що призводить до ураження тканин.

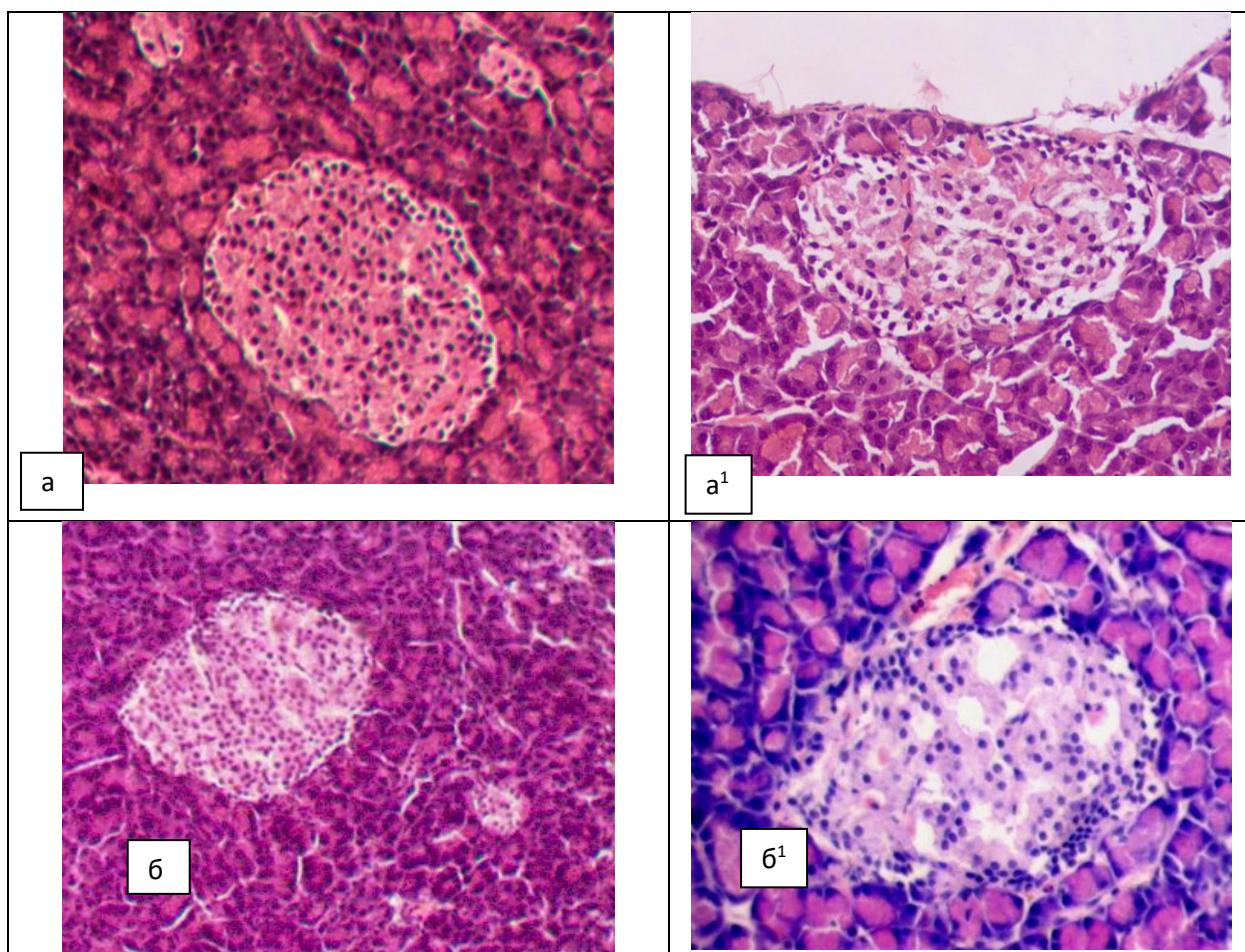


Рис. 5.17. Підшлункова залоза щурів після введення метформіну (а, а¹) та відвару збору «Арфазетин» (б, б¹) на тлі ІР, яка індукована ВФД (групи ВДФ_ПЕарф (а, а¹) та ВДФ_ПЕцис (б, б¹): стан бета-клітин ПО не змінено (а, б); дистрофічні зміни бета-клітин острівців (а¹, б¹). Гематоксилін-еозин. а, а¹, б¹ – х200. б - х100.

Висновки до розділу 5

1. За даними гістологічних досліджень, морфометричного аналізу та досліджень оксидативного статусу доведено захисний вплив досліджуваних екстрактів ПЕарг на ПЕцис на структурно-функціональний стан підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності.
2. Встановлено, що введення досліджуваних екстрактів ПЕарг на ПЕцис сприяло зменшенню морфологічних ознак функціональних змін ендокринної паренхіми

підшлункової залози порівняно з модельною патологією, гальмуючи підвищену оксидативний стрес.

3. За вираженістю панкреопротекторної дії ПЕарг та ПЕцис за більшістю показників перевищував дію препарату порівняння збору «Арфазетин» та був на рівні референс-препарату метформін.

Результати проведених досліджень опубліковані в роботах:

1. Kravchenko G., Krasilnikova O., Raal A., Matar M., Chaika N., Kireyev I., Grytsyk A., Koshovyi O. Arctostaphylos uva-ursi L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>. (**Scopus**). (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження щодо одержання екстрактів та вивчення їх хімічного складу, статистична обробка результатів, підготовлено статтю до друку).

2. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Мазен М. Вплив поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну на стан підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності. Двадцяті Данилевські читання. Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: збірник тез наук.-практ. конф. з онлайн-трансляцією 11 лютого 2021, м. Харків. ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», 2021. С. 34-35.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дані медичної статистики підтверджують, що кожен п'ятий житель Землі або вже хворий на ЦД2, або в найближчі 10 років у нього розвинеться діабет. Причиною розвитку ЦД2 можуть бути численні чинники, такі як спадковість, вік, маса тіла, стрес, харчування, гіподинамія, куріння [172]. Слід зазначити, що ЦД2 і супутні патології розвиваються досить довго з прихованою симптоматикою. У цей ранній період, коли рівень глюкози в крові натще залишається нормальним завдяки гіперінсулінемії, функціональна активність бета-клітин змінюється і з підвищенням толерантності до глюкози призводить до стану ІР, коли підвищеної продукції інсуліну недостатньо для її подолання [173]. Посилюється пригнічення бета-клітин, знижується синтез інсуліну і вже активно розвивається відносний дефіцит інсуліну з усіма наслідками. Метою лікування ЦД2 є досягнення та підтримка стану, при якому прояви захворювання та ймовірність ускладнень мінімальні, а якість життя максимально висока. Таким чином, гіпоглікемічні пероральні препарати, які зараз використовуються в клінічній практиці, представлені декількома групами, які відрізняються одна від одної не тільки механізмом дії, але й механізмами побічної дії, що необхідно враховувати при виборі терапії. Застосування препаратів, які містять рослинні компоненти, дозволяє мінімізувати побічні ефекти синтетичних препаратів і вплинути на всі ланки процесу патогенезу. На даний час було досліджено та продовжує досліджуватися досить велика кількість субстанцій рослинного походження, які потенційно мають гіпоглікемічну дію [174]. Але, на жаль, в даний час існує дуже обмежений вибір антигіперглікемічних лікарських засобів рослинного походження.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному дослідженню гіпоглікемічної, антиоксидантної, гепатопротекторної та ліпотропної активності вперше одержаних екстрактів з листя мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi*), без додавання та з додаванням амінокислот, для корекції стану ІР та, відповідно, як перспективних компонентів комплексної терапії ЦД2.

Взагалі в роботі була досліджена гіпоглікемічна активність 13 нових оригінальних сухих екстрактів мучниці звичайної листя без та з додаванням амінокислот, які були отримані на кафедрі фармакогнозії Національного фармацевтичного університету під керівництвом проф. Кошового О.М.

Перший етап експерименту передбачав проведення первинних скринінгових досліджень гіпоглікемічної активності на тваринах з нормальним вуглеводним гомеостазом. Були досліджені три нові поліфенольні сухі екстракти мучниці звичайної листя – 50% спиртовий (ПЕ₅₀), 90% (ПЕ₉₀) та водний (ПЕ_В). Для оцінки їхньої гіпоглікемічної дії був використаний ОТТГ, який є важливим тестом для ранньої діагностики ЦД2. Результатом цих досліджень було визначення екстракту з найбільш високою гіпоглікемічною активністю. Для подальшої модифікації був відібраний ПЕ₅₀ з листя мучниці звичайної. Також була визначена його найбільш ефективна доза – 100 мг/кг. Результати токсикологічних досліджень дозволяють зробити висновок про низьку токсичність досліджуваних об'єктів. Було встановлено, що середньолетальні дози ПЕ₅₀ перевищують 5000 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні та 1000 мг/кг при внутрішньочеревинному введенні, що дозволяє віднести ПЕ₅₀ до класу V – «практично нетоксичні речовини».

Після модифікації ПЕ₅₀ додаванням 10 відібраних амінокислот (цистеїну, фенілаланіну, валіну, гліцину, аланіну, лейцину, гістидину, лізину, аргініну, глютамінової кислоти), з отриманням 10 нових екстрактів, був здійснений *другий етап експериментального дослідження*, який включав скринінгові дослідження гіпоглікемічної активності з метою відбору найбільш активних модифікованих поліфенольних екстрактів для подальшого вивчення. Для цього також використовували ОТТГ у нормоглікемічних щурів. Для більшої наочності також розраховували AUC. Найактивнішими модифікованими екстрактами виявилися поліфенольні екстракти з додаванням аргініну (ПЕ_{арг}) та цистеїну (ПЕ_{цис}). Введення ПЕ₅₀ достовірно знижувало концентрацію глюкози в крові через 60 хвилин на 14,3 % порівняно з групою контрольної патології. У той же час додавання амінокислот підсилює цей ефект. Так, у групі тварин ПЕ_{арг} рівень

глюкози знизився через годину на 16 %, у групі тварин ПЕцис – на 15,2 %, що дещо поступається ефективності референтному препарату метформіну, але практично не відрізняється від дії збору «Арфазетин». Таким чином, вперше експериментально доведено, що додавання амінокислот аргініну та цистеїну до поліфенольного екстракту ПЕ₅₀ потенціює його гіпоглікемічну активність. Це дало підстави для того, щоб відібрати ПЕарг та ПЕцис для подальшого дослідження їхньої гіпоглікемічної дії.

Третій етап експериментального дослідження передбачав подальше поглиблене дослідження відібраних екстрактів та вивчення можливих механізмів їхньої антигіперглікемічної дії. Дослідження фармакологічної активності субстанцій проводили на моделях ІР, які потенційно призводять до розвитку ЦД2. Були вибрані дві моделі, ефективність яких була доведена в багатьох експериментах на щурах: ІР викликана тривалими внутрішньоочеревинними ін'єкціями низьких доз дексаметазону та дієта з високим вмістом фруктози.

Для вивчення можливих механізмів антигіперглікемічної дії визначалися показники, які характеризують ліпідний обмін та стан печінки, як одного з основних органів, який приймає участь у розвитку ІР. В усіх експериментальних групах тварин, в яких моделювали патологію, розвиток ІР доводився за допомогою розрахунку індексу НОМА-ІР. При проведенні ОТТГ, було встановлено, що в групі тварин з дексаметазон-індукованою ІР значення АUC, було принаймні в 3 рази більше, ніж відповідна площа у інтактних тварин. Достовірні зміни в концентрації глюкози в крові були зафіксовані при пероральному прийомі ПЕарг та ПЕцис протягом 14 діб, так спостерігали зниження рівня глюкози на 36,5 % та 35,1 %, відповідно, при порівнянні з групою контрольної патології. Ефект, що спостерігали перевищував ефект ПЕ₅₀ (26,4 %) і наближався до результату, який спостерігався в групі тварин, які отримували референс-препарат метформін (38,2 %).

У групі тварин, які отримували ВФД базальний рівень глюкози достовірно, у 1,69 рази, перевищував показники інтактного контролю. Це відбилося на площі

AUC, яка була вдвічі більшою, ніж у інтактних тварин. ОТТГ показав, що у тварин після двотижневого введення ПЕарг та ПЕцис, рівень глюкози в крові на 30-й та 60-й хвилинах був достовірно нижче при порівнянні з контрольною патологією, а до 120-ї хвилини досягло вихідного рівня. Ефект ПЕарг і ПЕцис, що спостерігався на 120-й хвилині після навантаження глюкозою, був вірогідно вищим за аналогічний показник екстракту ПЕ₅₀ без амінокислот. У результаті проведених досліджень доведена здатність ПЕарг та ПЕцис при 14-днівному введенні знижувати базальну глікемію та постпрандіальну глікемію після навантаження глюкозою у тварин з експериментальною інсулінорезистентністю. Базальна глікемія при введенні ПЕарг була на 36,4%, а ПЕцис 35,07% нижче, чим гіперглікемія, яка викликана дексаметазон-індукованою інсулінорезистентністю. Гальмування розвитку дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності підтверджується зменшенням AUC при введенні ПЕарг та ПЕцис на 52,92% та 50,71%, відповідно. За умов високофруктозної дієти базальна глікемія в групі контрольної патології була менше, ніж після ін'єкцій дексаметазону, при введенні ПЕарг знижувалася на 25,28%, а ПЕцис – на 21,76%.

Підвищення чутливості до глюкози за умов інсулінорезистентності, яка викликана високофруктозною дієтою, підтверджується зменшенням AUC при введенні ПЕарг та ПЕцис на 33,44% та 28,25%, відповідно. За ефективністю гіпоглікемічного ефекту на тлі різних моделей експериментальної інсулінорезистентності, як ПЕарг, так і ПЕцис переважають ПЕ₅₀, що вказує на потенціювання аргініном і цистеїном здібності одержаних субстанцій нормалізувати толерантність до глюкози.

Показано, що ПЕарг і ПЕцис після двотижневого введення виявили здатність знижувати рівень глюкози в крові у щурів з ІР, а також гальмувати розвиток ІР і покращувати толерантність до глюкози при експериментальній ІР. Отримані дані свідчать про важливу роль модифікації ПЕ₅₀ аргініном та цистеїном для корекції наслідків ІР, імовірно на процеси передачі сигналу в клітинах-мішенях інсуліну.

Діабетична гіперліпідемія – це сукупність багатьох порушень у ліпідному обміні, зокрема, порушенню співвідношення ЛПНЩ (зростає) та ЛПВЩ (зменшується) в сироватці крові. Таке відхилення вмісту ліпопротеїнів є надзвичайно атерогенним і супроводжується підвищенням рівнем ТГ у плазмі. У клінічній практиці це означає, що рівень ТГ слід підтримувати якомога нижчим у пацієнтів з ЦД2 [175].

Характерною ознакою діабетичної дисліпідемії є високий рівень ТГ із низьким рівнем ЛПВЩ. Це є фактором ризику прискореного атеросклерозу. Епідеміологічні дослідження, які були виконані ще в 1970-х роках встановили сильний зворотний зв'язок між низьким рівнем ЛПВЩ та ішемічною хворобою серця. Саме ЛПВЩ-Хс, а не вміст Хс. Посилення синтезу Хс та ТГ у печінці сприяє формуванню ЛПДНЩ у більшій кількості. Дані ліпопротеїни, потрапляючи в кров'яне русло, піддаються дії ліпопротеїніпази, призводячи до утворення частинок ЛПНЩ [176].

Особливості ліпідного спектру при ЦД2 характеризується гіперліпідемією, одним з факторів, який призводить до серцево-судинних захворювань. Підвищений рівень ТГ та ЛПНЩ-Хс та низький рівень ЛПВЩ навіть назвали «ліпідною тріадою» [177]. Такий стан обумовлений декількома причинами: в результаті ІР та недостатньої секреції інсуліну порушується постпрандіальна регуляція ліпідів, підвищується рівень ВЖК в сироватці крові, збільшується продукування печінкою ЛПДНЩ та знижується їх гідроліз ліпопротеїніпазою, що призводить до зростання кількості багатих на ТГ циркулюючих ліпопротеїдних частинок. Це призводить до зниження ЛПВП-Хс за рахунок підвищеного переносу естерів Хс із ЛПВП в ЛОНП і хіломікрони в обміні на ТГ [178].

Встановлена здатність ПЕарг та ПЕцис коригувати дисліпідемію, яка розвивається на тлі експериментальної інсулінорезистентності, що підтверджено нормалізацією показників ліпідного спектру крові. В умовах дексаметазон-індукованої інсулінорезистентності вміст загальних ліпідів в сироватці крові збільшився на 77,3%, на тлі введення ПЕарг та ПЕцис протягом 2 тижнів

зростання становило лише 29,6 % та 25,3% відповідно. Вміст загального холестеролу та тригліцеридів у тварин групи контрольної патології збільшився на 42,2% та 83,4% відповідно, вплив досліджуваних екстрактів відбувався зростанням цих показників лише на 29,6% та 32,4% (ПЕарг) та 25,3% та 25,6% (ПЕцис). В умовах високофруктозної дієти введення ПЕарг зменшувало вміст загального холестеролу на 53,5%, а холестеролу ЛПНЩ на 38,5%, в той же час вплив ПЕцис відбувався зниженням цих показників відповідно на 59,2% та 57,9%. Таким чином, ПЕцис виявив більш виразну гіполіпідемічну дію.

Стійка гіперглікемія при ЦД2 викликає утворення активних форм кисню (АФК), які є фактором ризику розвитку макро- і мікрососудистих ускладнень при ЦД [179]. На тлі підвищеної продукції АФК відбувається зниження активності антиоксидантних ферментів, що може привести до розвитку ЕД та ІР [180]. ІР є поширеним станом, який може приводити до глибоких порушень метаболізму і на кінцевої стадії до розвитку ЦД2. Якщо раніше дослідження ЦД2 типу були зосереджені на дисфункції бета-клітин ПЗ та вивчення резистентності до інсуліну, то в останні роки спостерігається глибокий інтерес до ролі, яку відіграє окислювальний стрес у периферичних тканинах приіндукції ІР.

Одним із способів запобігання активації процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) є застосування антиоксидантів, здатних гальмувати процес вільнорадикального окислення. Введення ПЕарг та ПЕцис попереджає розвиток оксидативного стресу в тканинах печінки на тлі експериментальної інсулінорезистентності пригнічуючи утворення активних форм кисню, і сприяє підвищенню активності ключових ферментів антиоксидантної системи. За умов десаметазон-індукованої інсулінорезистентності рівень ТБК активних продуктів у гомогенаті печінки підвищувався на 72,1%, а рівень ГлВ зменшувався на 30,9% ($p \leq 0,05$), що свідчить про активацію процесів ПОЛ. Певною мірою це був передбачуваний результат, оскільки розвиток оксидативного стресу за умов ІР узгоджується з численними літературними даними [181].

Вміст ТБК-АП знижувався при введенні ПЕарг та ПЕцис на 38,6% та 64,3%, відповідно, відносно групи тварин з контрольною патологією ($p \leq 0,05$).

Резерви ГлВ зберігалися під дією досліджуваних екстрактів, вони зменшувалися лише на 5,4% (ПЕцис) та 8,9% (ПЕарг) ($p \leq 0,05$). Це співвідносилося зі зростанням активності глутатіонпероксидази, активність якої на тлі інсулінорезистентності знижувалася у 2,1 рази, введення ПЕарг та ПЕцис підвищувало активність ферменту на 17,3% та 19,3%, відповідно, порівняно з групою контрольної патології ($p \leq 0,05$). Застосування високофруктозної дієти в нашому експерименті призводило до збільшеного рівня ТБК-АП в 3,1 рази, зниження вмісту ГлВ в 1,5 разів і пригнічення активності ГП в 1,6 разів в гомогенаті печінки порівняно з інтактними тваринами ($p \leq 0,05$). Вплив двотижневого введення ПЕарг та ПЕцис на тлі високофруктозної дієти мало результатом зниження вмісту ТБК-АП на 42,4% та 44,3%, збільшений вміст ГлВ на 23,9% та 16,6% та збільшена активність ГП на 23,7% та 18,7%, відповідно, порівняно з групою контрольної патології ($p \leq 0,05$). Позитивні зміни показників оксидантно-антиоксидантної системи на тлі інсулінорезистентності були більш виразними при введенні ПЕарг та ПЕцис порівняно з введенням ПЕ50 та референс-препарату «Арфазетин». Це свідчить, що додавання амінокислот цистеїну та аргініну потенціювало антиоксидантну активність, в той же час, ПЕцис має більш виразну антиоксидантну активність за умов інсулінорезистентності.

Печінка є життєво важливим органом у метаболізмі, який відіграє важливу роль у регуляції гомеостазу глюкози. Визначення активності АЛаТ, АСаТ та ГГТП може слугувати маркером дисфункції печінки, в тому числі у випадку ураження печінки, яке пов'язане з ІР та ризиком ЦД2. АЛаТ вважається специфічним маркером ураження печінки та виявляється переважно в цьому органі, тоді як ГГТП мембраннов'язаний фермент, який дуже активний у печінці, ПЗ та нирках. ГГТП опосередковує поглинання глутатіону та, як вважають, збільшення її активності в сироватці крові пов'язане з окислювальним стресом і хронічним запаленням, що, в свою чергу, вважаються важливими шляхами розвитку ЦД2 [182]. Таким чином, печінкові ферменти можуть бути біологічними маркерами, що допомагають діагностувати ураження печінки при

ЦД2.

Встановлено, що за умов різних моделей експериментальної інсулінорезистентності ПЕцис та ПЕарг чинили гепатопротекторну дію, що верифіковано зниженням активності в сироватці крові ферментів, які характеризують цілісність тканин печінки. Розвиток як дексаметазон-індукованої дієти, так і дієти індукованої високим вмістом фруктози негативно впливали на стан печінки, активність досліджуваних ферментів зростала достовірно. Гепатопротекторна дія ПЕцис та ПЕарг доведена за статистично значущим зменшенням активності АлАТ у 1,39 та 1,78 рази, АсАТ у 1,61 та 1,82 рази та ГГТП в 1,36 та 1,87 рази, відповідно, відносно тварин з дексаметазон-індукованою інсулінорезистентністю. За умов високофруктозної дієти зафіксовано зменшення активності печінкових ферментів в сироватці крові при введенні ПЕцис та ПЕарг АлАТ у 1,35 та 1,66 рази, АсАТ у 1,49 та 1,65 рази та ГГТП в 1,36 та 1,87 рази, відносно контрольної патології. Досягнуте зниження не нормалізувало активність ферментів, однак протекторна дія ПЕцис та ПЕарг перевищує активність ПЕ50 та препарату порівняння «Арфазетин». Застосування екстрактів ПЕарг та ПЕцис призвело до зменшення проявів холестатичного синдрому: спостерігалася нормалізація активності ЛФ та значне зниження активності ГГТП, відповідно на 31,2% та 30,5%. Збір «Арфазетин», як препарат порівняння, також сприяв значному поліпшенню зовнішньо-секреторної функції печінки та знижував активність маркерних ферментів, проте, на відміну від досліджуваних поліфенольних екстрактів з насіння винограду, не нормалізував активність ЛФ.

Результати експериментів довели певні відмінності в активності досліджуваних екстрактів, так ПЕцис має більш виразну антиоксидантну та ліпотропну активність, однак, ПЕарг виявив більшу здатність до зниження рівня глюкози в крові на тлі ІР.

Таким чином, при вивченні потенціальних механізмів дії ПЕарг та ПЕцис, а саме гіполіпідемічної дії та гепатопротекторної дії, зазначені субстанції демонстрували суттєвий вплив на показники, що досліджувалися і на тлі

дексаметазон-індукованої ІР та ІР, яка викликана ВФД. Коротко узагальнюючи результати можна підкреслити, що обидва поліфенольних екстракти з додаванням амінокислот достовірно знижували ЗЛ та ВЖК сироватки крові. Також, обидва екстракти очікувано виявили антиоксидантну активність, що вплинуло на пригнічення оксидативного стресу. Показники, а саме, активність ферментів АлАТ, АсАТ, ЛФ, ГГТП та холінестерази ХЕ, які характеризують стан печінки, стабілізувалися після двотижневого введення ПЕарг та ПЕцис на тлі ІР.

Третій етап експериментальних досліджень також передбачав гістоморфологічні дослідження ПЗ після 14-денного введення ПЕарг та ПЕцис на тлі експериментальної ІР. Крім оцінки патоморфологічних змін острівців Ларгенганса, в гомогенатах підшлункової залози визначали показники, які можуть вказувати на наявність оксидативного стресу (ТБК-АП, ДК, ГлВ) та активність ферментів системи антиоксидантного захисту (СОД, КАТ та ГП).

При моделюванні ІР нами було зафіксовано виснаження бета-клітин ПЗ і гіперінсулінемія у відповідь на штучні чинники, такі ознаки виникають у початковому періоді захворювання на ЦД2. ІР у тканинах-мішенях і дефіцит секреції інсуліну бета-клітинами ПЗ є основними ознаками ЦД2. Відносний дефіцит інсуліну як наслідок неспроможності бета-клітин компенсувати резистентність до інсуліну прогресує у явний ЦД2 [183]. Обидві застосовані моделі мають підґрунтя, яке імітує можливий розвиток ЦД2 у людини.

Гіперглікемія стимулює секреторну активність, що може привести до виснаження бета-клітин, що і спостерігалось в нашому експерименті при гістологічних дослідженнях. Як і в інших органах, стійка гіперглікемія може викликати надлишкову генерацію АФК в ПЗ, що призводить до подальшого руйнування бета-клітин і погіршення глікемічного статусу. Зростання рівня глюкози в крові посилює ІР, що, створюючи замкнене порочне коло, призводить до втрати чутливості бета-клітинами, в свою чергу сприяє гіперглікемії.

ПЗ є мішенню оксидативного стресу, як і інші тканини за умов ІР. Пошкодження мітохондрій і помітне пригнічення секреції інсуліну може бути наслідком накопичення H_2O_2 , тому що глюкози в мітохондріях є важливим

стимулом цієї секреції [184]. Надмірне окислення глюкози також робить свій вклад в накопичення АФК [185]. Треба відмітити, що бета-клітини мають нижчий рівень антиоксидантних ферментів, зокрема, СОД, КАТ та ГП і більш чутливі до оксидативного стресу. Сполуки, які мають антиоксидантні властивості здатні захистити тканини ПЗ від токсичності оксидативного стресу [186]. Такі сполуки містяться в досліджуваних екстрактах – це, більшою мірою, арбутин та галова кислота, цистеїн та інші, властивості яких ми обговорювали у Розділі 1.

Розвитку оксидативного стресу сприяє ліпотоксичність, високий рівень ВЖК призводить до дисфункції бета-клітин [187]. Однією з причин підвищення концентрації неетерифікованих жирних кислот за умов ЦД2 є посилений ліполіз адипоцитів. Накопичення довголанцюгових ацил-КоА, що призводить до пригнічення функції бета-клітин як раз і спричинено надмірним окисненням жирних кислот. Ацили-КоА жирних кислот можуть пригнічувати секреторну функцію, відкриваючи K^{+} -чутливі канали АТФ бета-клітин [188]. Таким чином, порушення секреції інсуліну та дисфункція бета-клітин тісно пов'язані з виробництвом АФК, стимульованим надлишком ВЖК [189].

Гіперглікемія, гіперліпідемія та оксидативний стрес, які супроводжують ІР та ЦД2, і які ми спостерігали у щурів з експериментальною ІР в нашому експерименті, надають виражений негативний вплив на ПЗ, що вимагає максимального захисту. При прогресуванні ІР до ЦД2 можуть бути залучені численні клітинно-специфічні відповіді, включно зі змінами передачі сигналу, починаючи з GLUT2 на ранніх стадіях [190], результатом яких є дісліпідемія, ураження печінки, оксидативний стрес у тканинах печінки та ПЗ та дегенеративні зміни ендокринної та, навіть, екзокринної частини ПЗ, які були зафіксовані в наших експериментах.

На основі отриманих даних встановлено, що стан дексаметазон-індукованої ІР призводить до виникнення морфологічних ознак певної пригніченості інсулярного апарату. Насамперед це проявляється у підвищенні чисельності дрібних панкреатичних островців та зменшенню частки середніх;

посилений режим функціонування бета-клітин призводить до гіпертрофії та дистрофії і, в подальшому, до їхньої загибелі та різного ступеню спустошеності, що є характерним для картини ЦД2. В підшлунковій залозі щурів після введення ПЕарг та ПЕцис в ендокринній паренхімі гістологічно виявлено менш показові деструктивно-дистрофічні прояви та візуалізація збільшення морфологічно більш повноцінних інсуліноцитів. В певній мірі відновлюється кількісний вміст панкреатичних островців та нормальний відсотковий розподіл їх за розміром (наповненістю бета-клітинами). Встановлено, що введення ПЕарг на ПЕцис, сприяло зменшенню морфологічних ознак функціональних змін ендокринної паренхіми, що проявлялося у нормалізації співвідношення розміру панкреатичних островців, порівняно з модельною патологією. Оптична щільність та функціональний індекс панкреатичних островців, які зменшувалися на тлі інсулінорезистентності, зростали після введення ПЕарг та ПЕцис: оптична щільність – на 10,08% та 11,09%, відповідно, і функціональний індекс – на 15,38% та 19,41%, відповідно.

Отримані гістологічні результати свідчать, що тривале надходження надлишку фруктози призводить до гіпертрофії ядр частини бета-клітин, спустошення деяких островців, збільшення частки дрібних островців та інші негативні наслідки. ВФД також призводить до певної активації компенсаторно-адаптивних змін інсулярного апарату щурів та провокує виникнення дистрофічно-деструктивних змін в низці панкреатичних островців, спустошення деяких островців. Але ця картина морфологічно відрізняється від такої, яка індукована дексаметазоном. А саме, зареєстрована поява «розпластаних» великих островців. ПЕарг та ПЕцис надають захисний ефект стосовно розвитку змін, які викликані ІР, у щурів, які отримували ВФД. Морфологічно це проявляється у зменшенні деструктивно-дистрофічно змінених та збільшенні функціонально повноцінних інсуліноцитів, і, як наслідок, відновленні (в тому чи іншому ступеню) нормального розподілу панкреатичних островців за розміром. Оптична щільність та функціональний індекс панкреатичних островців залишалася стабільною у тварин, яким вводили ПЕарг та ПЕцис на тлі

високофруктозної дієти. Аналіз результатів гістологічних досліджень щурів групи ВДФ виявив різке пригнічення функцій ПЗ, яке покращувалося після введення ПЕарг та ПЕцис і референс-препарату метформіну. Подібним чином, гістологічні аномалії, викликані ВФД, покращувалися після введення ПЕ50 та референс-препарату збору «Арфазетин». Однак, виходячи з гістологічної картини, введення ПЕарг та ПЕцис захищало цілісність бета-клітин ПЗ більш суттєво. Корисні ефекти ПЕцис та ПЕарг можуть бути пов'язаний із антиоксидантними властивостями враховуючи те, що хронічна гіперглікемія провокує надмірне виробництво АФК у підшлунковій залозі, що призводить до ураження тканин [191]. Індикатори активації ПОЛ були підвищені в гомогенаті підшлункової залози разом із численними гістопатологічними змінами, що відбуваються внаслідок пошкодження ПЗ, спричиненого хронічною гіперглікемією, опосередкованою окислювальним стресом.

За даними гістологічних досліджень, морфометричного аналізу та досліджень оксидативного статусу доведено захисний вплив досліджуваних екстрактів ПЕарг на ПЕцис на структурно-функціональний стан ПЗ на тлі експериментальної ІР. За вираженістю панкреопротекторної дії ПЕарг та ПЕцис за більшістю показників перевищували панкреопротекторну дію препарату порівняння збору «Арфазетин».

Таким чином, отримані експериментальні результати виявили значущість листя мучниці звичайної як сировини для створення препарату з гіпоглікемічною дією та є обґрунтуванням доцільності створення на основі ПЕарг та ПЕцис нових антигіперглікемічних засобів для комплексного лікування ЦД2, що потребує наступних поглиблених досліджень.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та експериментально вирішено актуальне завдання фармакології по пошуку нових оригінальних засобів рослинного походження з антигіперглікемічною дією для профілактики та корекції цукрового діабету 2 типу.

1. За результатами скринінгових досліджень гіпоглікемічної активності сухих екстрактів мучниці звичайної листя на щурах з нормальним вуглеводним гомеостазом встановлено, що найбільш ефективним є поліфенольний екстракт, одержаний 50% етанолом (ПЕ₅₀), для якого було встановлено ефективну дозу – 100 мг/кг. Результати токсикологічних досліджень дозволили віднести ПЕ₅₀ до класу V – «практично нетоксичні речовини».

2. За даними скринінгових досліджень гіпоглікемічної активності нових субстанцій одержаних шляхом модифікації ПЕ₅₀ амінокислотами на щурах з нормальним вуглеводним гомеостазом для подальшого поглибленого дослідження були відібрані екстракти, які виявили найбільшу ефективність – з додаванням аргініну та цистеїну (умовні позначення ПЕарг та ПЕцис, відповідно). При проведенні ОТТГ на щурах з нормальним вуглеводним гомеостазом, було встановлено, що введення досліджуваних екстрактів обмежувало постпрандіальну гіперглікемію протягом експерименту, що підтверджено зниженням площі під глікемічною кривою (AUC) – на 12,50% при введенні ПЕцис та на 13,09% при введенні ПЕарг порівняно з контролем.

3. Експериментально доведена здатність ПЕарг та ПЕцис знижувати базальну глікемію та постпрандіальну глікемію після навантаження глюкозою у тварин з експериментальною інсулінорезистентністю (ІР).

За дії ПГарг рівень глюкози знижувався на 36,40%, а ПЕцис – 35,07% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з гіперглікемією на тлі дексаметазон-індукованої ІР. Гальмування розвитку дексаметазон-індукованої ІР підтверджується зменшенням AUC при введенні ПЕарг та ПЕцис на 52,92% та 50,71% ($p \leq 0,05$) відповідно. За умов високофруктозної дієти базальна глікемія в групі контрольної патології була менше, ніж після ін'єкцій дексаметазону, та при введенні ПЕарг знижувалася на 25,28%, а ПЕцис – на 21,76% ($p \leq 0,05$).

Підвищення чутливості до глюкози за умов ІР, яка викликана високофруктозною дієтою, підтверджується зменшенням АUC за дії ПЕарг та ПЕцис на 33,44% та 28,25% ($p \leq 0,05$), відповідно. За ефективністю гіпоглікемічного ефекту на тлі різних моделей експериментальної ІР, як ПЕарг, так і ПЕцис переважають ПЕ₅₀, що вказує на потенціювання аргініном і цистеїном здатності одержаних субстанцій нормалізувати толерантність до глюкози.

4. Визначений ефект ПЕарг та ПЕцис коригувати дисліпідемію у тварин з ІР. За умов дексаметазон-індукованої ІР вміст загальних ліпідів в сироватці крові збільшився на 77,3%, а на тлі введення ПЕарг та ПЕцис протягом 2 тижнів зростання становило лише 29,6% та 25,3% ($p \leq 0,05$), відповідно. Рівень загального холестеролу та тригліцеридів у тварин групи контрольної патології зростав на 42,2% та 83,4%, відповідно, вплив досліджуваних екстрактів (ПЕарг) та (ПЕцис) знижував вміст холестеролу на 25,6% та 27,3%, а тригліцеридів на 25,3% та 25,6%, відповідно, порівняно з групою ІР щурів ($p \leq 0,05$). Введення ПЕарг зменшувало вміст загального холестеролу на 53,5%, а холестеролу ЛПНЩ на 38,5%, в той же час результатом впливу ПЕцис було зниження цих показників відповідно на 59,2% та 57,9% ($p \leq 0,05$). Отже, ПЕцис виявив більш виразну гіполіпідемічну дію.

5. Введення ПЕарг та ПЕцис попереджає розвиток оксидативного стресу в тканинах печінки на тлі експериментальної ІР, пригнічуючи утворення активних форм кисню, і сприяє підвищенню активності ключових ферментів антиоксидантної системи. Вміст ТБК активних продуктів на тлі дексаметазон-індукованої ІР знижувався при введенні ПЕарг та ПЕцис на 38,6% та 64,3% ($p \leq 0,05$), відповідно, відносно групи тварин з контрольною патологією. Резерви ГлВ зростали за дії досліджуваних екстрактів, були вище на 31,8% (ПЕцис) та 37,1% (ПЕарг) ($p \leq 0,05$), в той же час, активність глутатіонпероксидази після введення ПЕарг та ПЕцис підвищувалась на 17,3% та 19,3% ($p \leq 0,05$), відповідно, порівняно з групою контрольної патології.

Вплив двотижневого введення ПЕарг та ПЕцис на тлі високофруктозної дієти позначився зниженням вмісту ТБК-АП на 42,4% та 44,3%, збільшений вміст ГлВ на 23,9% та 16,6% та збільшена активність ГП на 23,7% та 18,7%,

відповідно, порівняно з групою контрольної патології ($p \leq 0,05$). Позитивні зміни показників оксидантно-антиоксидантної системи на тлі ІР були більш виразними при введенні ПЕарг та ПЕцис порівняно з ПЕ₅₀ та референс-препарату «Арфазетин». Це може свідчити, що додавання амінокислот цистеїну та аргініну потенціювало антиоксиданту активність, з переважаючим ефектом ПЕцис.

6. Встановлено, що за умов різних моделей експериментальної ІР ПЕцис та ПЕарг чинили гепатопротекторну дію. Що позначилось вірогідним зниження активності АлАТ у 1,39 та 1,78 рази, АсАТ у 1,61 та 1,82 рази та ГГТП в 1,36 та 1,87 рази, при введенні ПЕарг та ПЕцис, відповідно, відносно тварин з дексаметазон-індукованою ІР. За умов високофруктозної дієти зафіксовано зменшення активності печінкових ферментів в сироватці крові при введенні ПЕцис та ПЕарг АлАТ у 1,35 та 1,66 рази, АсАТ у 1,49 та 1,65 рази та ГГТП в 1,36 та 1,87 рази ($p \leq 0,05$), відносно контрольної патології. Протекторна дія ПЕцис та ПЕарг перевищує активність ПЕ₅₀ та препарату порівняння «Арфазетин».

7. За даними гістологічних досліджень, морфометричного аналізу та досліджень оксидативного статусу встановлено, що введення досліджуваних екстрактів ПЕарг та ПЕцис за умов дексаметазон-індукованої ІР, сприяло зменшенню морфологічних ознак функціональних змін ендокринної паренхіми, що проявлялося у нормалізації співвідношення розміру панкреатичних островців, порівняно з модельною патологією. Оптична щільність панкреатичних островців зростала після введення ПЕарг та ПЕцис на 10,08% та 11,09%, а функціональний індекс – на 15,38% та 19,41%, відповідно. За вираженістю панкреопротекторної дії ПЕарг та ПЕцис за більшістю показників перевищували панкреопротекторну дію препарату порівняння збору «Арфазетин».

7. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням доцільності створення на основі ПЕарг та ПЕцис нових антигіперглікемічних засобів для комплексного лікування цукрового діабету 2 типу, що потребує подальших поглиблених досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus / U. Galicia-Garcia et al. *Int J Mol Sci*. 2020. № 21(17). P. 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.
2. Diabetes Atlas Committee Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition / P. Saeedi et al. *Diabetes research and clinical practice*. 2019. № 157. P. 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>.
3. Antidiabetic Phytochemicals from Medicinal Plants: Prospective Candidates for New Drug Discovery and Development / Alam S. et al. *Front. Endocrinol*. 2022. № 13. P. 800714. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.800714>.
4. Vaccinium Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants / G.A. Ńau Martet al. *Molecules*. 2023. № 28. P. 1533. <https://doi.org/10.3390/molecules28041533>.
5. Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Leaves Extract and Its Modified Arginine Preparation for the Management of Metabolic Syndrome-Chemical Analysis and Bioactivity in Rat Model / O. Koshovyi et al. *Nutrients*. 2021. № 13(8). P. 2870. <https://doi.org/10.3390/nu13082870>.
6. Reed J., Bain S., Kanamarlapudi V. A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 2021. № 14. P. 3567–3602. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S319895>.
7. James, D.E., Stöckli, J., Birnbaum, M.J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. № 22, P. 751–771. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00390-6>.
8. Himanshu D., Ali W., Wamique M. Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2020. № 19(2). P. 1959–1966. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00641-x>.
9. White M. F., Kahn R. Insulin action at a molecular level – 100 years of progress. *Molecular Metabolism*. 2021. № 52. P. 101304. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101304>.

10. Nutrient Regulation of Pancreatic Islet β -Cell Secretory Capacity and Insulin Production / K.E. Rohli et al. *Biomolecules*. 2022. № 12. P. 335. <https://doi.org/10.3390/biom12020335>.
11. Eckstein S. S., Weigert C., Lehmann R. Divergent Roles of IRS (Insulin Receptor Substrate) 1 and 2 in Liver and Skeletal Muscle. *Current medicinal chemistry*. 2017. № 24(17). P. 1827–1852. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170426142826>.
12. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes / Huang X. et al. *Int J Biol Sci*. 2018. № 14(11). P.1483-1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>.
13. Klip A., McGraw T. E., James D. E. Thirty sweet years of GLUT4. *The Journal of biological chemistry*. 2019. 294(30), № 11369–11381. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008351>.
14. Saltiel A. R. Insulin signaling in health and disease. 2021. *The Journal of clinical investigation*, № 131(1). Art. e142241. <https://doi.org/10.1172/JCI142241>.
15. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms / H. Yaribeygi et al. *J Cell Physiol*. 2019. № 234(6). P. 8152-8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>.
16. Pathophysiology of type 2 diabetes and the impact of altered metabolic interorgan crosstalk / J. M. Sanches et al. *The FEBS journal*. 2023. № 290(3). P. 620-648. <https://doi.org/10.1111/febs.16306>.
17. Mechanisms of Insulin Action and Insulinresistance / M. C. Petersen et al. *Physiol Rev*. 2018. № 98. P. 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.201721330031-9333>.
18. Insulin Signal Transduction Perturbations in Insulin Resistance / M. Khalid et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. № 22(16). P. 8590. <https://doi.org/10.3390/ijms22168590>.
19. Reed J., Bain S., Kanamarlapudi, V. A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2021. № 14 P. 3567–3602. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S319895>.

20. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy / M. Li et al. *Sig Transduct Target Ther.* 2022. № 7. P. 216. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0>.
21. Lipoprotein(a) levels and risk of cardiovascular disease events in individuals with diabetes mellitus or prediabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities study / A. Saeed et al. *Atherosclerosis.* 2019. № 282. P. 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.022>.
22. Glimpse into Milestones of Insulin Resistance and an Updated Review of Its Management / A. I. Aedh et al. *Nutrients.* 2023. № 15(4). P.921. <https://doi.org/10.3390/nu15040921>.
23. Endogenous advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic diabetic complications / M. A. Mengstie et al. *Front. Mol. Biosci.* 2022. № 9. P. 1002710. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1002710>.
24. Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review / K. Kolczynska, al. *Lipids Health.* 2020. № 19. Art. 113. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01286-8>.
25. Lee S. H., Park S. Y., Choi C. S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J.* 2022. № 46(1). P.15-37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>.
26. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies / P. Zhang et al. *Front. Med.* 2020. № 14. P. 583–600. <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0729-1>.
27. Begum F., Lakshmanan K. Pathogenesis of type-2 diabetes mellitus and its complications – a narrative review. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases.* 2022. № 29, № 4. P. 480-484.
28. Rehman K., Akash M. S. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *J. Cell. Biochem.* 2017. № 118. P. 3577-3585. <https://doi.org/10.1002/jcb.26097>.
29. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome / N.B. Ruderman et al. *J. Clin. Investig.* 2013. № 123. P. 2764–2772. <https://doi.org/10.1172/JCI67227>.

30. Detrimental Effects of Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes: Exploring the Neutralizing Influence of Antioxidants. / S. C. Shabalala et al. *Antioxidants*. 2022. № 11(10). Art. 2071. <https://doi.org/10.3390/antiox11102071>. Oxidative stress in obesity and insulin resistance /Panic A. et al. *Explor Med*. 2022. № 3. P. 58–70. <https://doi.org/10.37349/emed.2022.00074>.
31. Ikegami H., Babaya N., Noso S. β -Cell failure in diabetes: Common susceptibility and mechanisms shared between type 1 and type 2 diabetes. *Journal of diabetes investigation*. 2021. № 12(9). P. 1526–1539. <https://doi.org/10.1111/jdi.13576>.
32. BACH2 inhibition reverses β cell failure in type 2 diabetes models / Son, J., The Journal of clinical investigation. 2021. № 131(24), Art. e153876. <https://doi.org/10.1172/JCI153876>.
33. Novel compounds reducing IRS-1 serine phosphorylation for treatment of diabetes / L. Simon-Szabó et al. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016. № 26(2). P. 424–428. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.099>.
34. Pandey M. K., DeGrado T. R. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging. *Theranostics*. 2016. № 6(4). P. 571-93. <https://doi.org/10.7150/thno>.
35. Lehtonen S. SHIPping out diabetes-Metformin, an old friend among new SHIP2 inhibitors. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020. № 228(1). Art. e13349. <https://doi.org/10.1111/apha.13349>.
36. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation / Entezari M. et al. *Biomed. Pharmacother*. 2022. № 146. P. 112563. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112563>.
37. Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes / Q. Meng et al. *J. Ethnopharmacol*. 2020. № 248. P. 112326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112326>.

38. Hesperidin ameliorates signs of the metabolic syndrome and cardiac dysfunction via IRS/Akt/GLUT4 signaling pathway in a rat model of diet-induced metabolic syndrome / P. Prasatthong et al. *Eur. J. Nutr.* 2021. № 60. P. 833–848. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02291-4>.

39. Functional foods with dipeptidyl peptidase-4 inhibitory potential and management of type 2 diabetes: A review / K. Mutiu et al. *Food Frontiers*. 2021. № 2(5). P. 1-10. <https://doi.org/10.1002/fft2.71>.

40. Berberine Decreases Intestinal GLUT2 Translocation and Reduces Intestinal Glucose Absorption in Mice / M. Zhang et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. № 23. P. 327. <https://doi.org/10.3390/ijms23010327>.

41. Deacon C. F. Physiology and Pharmacology of DPP-4 in Glucose Homeostasis and the Treatment of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*. 2019. № 10. Art. 80. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00080>.

42. PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? / M. Botta et al. *Int J Mol Sci.* 2018. № 19(4). P. 1197. <https://doi.org/10.3390/ijms19041197>.

43. The Potential Roles of Post-Translational Modifications of PPAR γ in Treating Diabetes / X. Zhang et al. *Biomolecules*. 2022. № 12(12). Art. 1832. <https://doi.org/10.3390/biom12121832>.

44. Diabetes mellitus Derek G. Waller BSc (, Anthony P. Sampson MA, PhD, FHEA, FBPhS, in Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition), 2018.

45. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion / P. Proks et al. *Diabetes. Suppl.* 2002. № 51(3). P. S368–S376. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.s368>.

46. Costello RA, Nicolas S, Shivkumar A. Sulfonylureas. 2023 Mar 7. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 30020597.

47. Mechanisms and Characteristics of Sulfonylureas and Glinides / W. Lv et al. *Current topics in medicinal chemistry*. 2020. № 20(1), P. 37–56. <https://doi.org/10.2174/1568026620666191224141617>.

48. Hypoglycemia Induced by Antidiabetic Sulfonylureas / L. Confederat et al. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 2015. № 119(2). P. 579–584. PMID: 26204670.
49. Padhi S., Nayak A. K., Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug-based therapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020. № 131. Art. 110708. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708>.
50. Rena G., Hardie D.G., Pearson E.R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017. № 60(9). P. 1577-1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017>.
51. LaMoia, T. E., Shulman, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocrine reviews*. 2021. № 42(1). P. 77–96. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>.
52. Ghosal S., Ghosal S. The Side Effects of Metformin - A Review. *J Diabetes Metab Disord*. 2019. № 6. Art. 030. <https://doi.org/10.24966/DMD-201X/100030>.
53. Recent Advances of α -Glucosidase Inhibitors: A Comprehensive Review / N. Agrawal et al. *Current topics in medicinal chemistry*. 2022. № 22(25). P. 2069–2086. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220831092855>.
54. Lebovitz H.E. Thiazolidinediones: The Forgotten Diabetes Medications. *Curr Diab Rep*. 2019. № 19(12). Art. 151. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1270-y>.
55. Meglitinide analogues for type 2 diabetes mellitus / C. Black et al. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. № 2. Art. CD004654. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004654.pub2>.
56. Improvement of Glucose Tolerance by Food Factors Having Glucagon-Like Peptide-1 Releasing Activity / Hira T. et al. *Int J Mol Sci*. 2021. № 12. Art. 6623. <https://doi.org/10.3390/ijms22126623>.
57. GLP-I secretion in healthy and diabetic Wistar rats in response to aqueous extract of *Momordica charantia* / G.A. Bhat et al. *BMC Complement Altern Med*. 2018. № 18. P. 162. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2227-4>.
58. Liu Z., Ma S. Recent Advances in Synthetic α -Glucosidase Inhibitors. *Chem Med Chem*. 2017. № 12(11). P. 819–829. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700216>.

59. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus / J.J. Marín-Peñalver et al. *World J Diabetes*. 2016. № 7(17). P. 354-95. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i17.354>.
60. Padda, I. S., Mahtani, A. U., & Parmar, M. (2022). Sodium-Glucose Transport Protein 2 (SGLT2) Inhibitors. In StatPearls. StatPearls Publishing.
61. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) / M. J. Davies et al. *Diabetes Care*. 2018. № 41(12). P. 2669-2701. <https://doi.org/10.2337/dci18-0033>.
62. Benefits and harms of drug treatment for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials / Q. Shi et al. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2023. № 381. P. e074068. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-074068>.
63. Sulfonylureas and their use in clinical practice / D. Sola et al. *Arch Med Sci*. 2015. № 11(4). P. 840-8. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.53304>.
64. Padhi S., Nayak A. K., Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2020. № 131, 110708. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708>.
65. Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components / B. Salehi et al. *Biomolecules*, 2019. № 9(10). P. 551. <https://doi.org/10.3390/biom9100551>.
66. Flavonoids and Insulin-Resistance: From Molecular Evidences to Clinical Trials / B. Russo et al. *International journal of molecular sciences*. 2019. № 20(9). P. 2061. <https://doi.org/10.3390/ijms20092061>.
67. Flavonoids and Insulin-Resistance: From Molecular Evidences to Clinical Trials / B. Russo et al. *International journal of molecular sciences*. 2019. № 20(9). Art. 2061. <https://doi.org/10.3390/ijms20092061>.
68. Action of Phytochemicals on Insulin Signaling Pathways Accelerating Glucose Transporter (GLUT4) Protein Translocation / A. S. Sayem. et al. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018. № 23(2). P. 258. <https://doi.org/10.3390/molecules23020258>.

69. Williamson G., Sheedy K. Effects of Polyphenols on Insulin Resistance. *Nutrients*. 2020. № 12 (10). Art. 3135. <http://doi.org/10.3390/nu12103135>.
70. Apple and pear consumption and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis of prospective cohort studies / X. F. Guo et al. *Food Funct.* 2017. № 8. P. 927–934. <https://doi.org/10.1039/c6fo01378c>.
71. Kowalski R., Gonzalez de Mejia E. Phenolic composition, antioxidant capacity and physical characterization of ten blackcurrant (*Ribes nigrum*) cultivars, their juices, and the inhibition of type 2 diabetes and inflammation biochemical markers. *Food Chemistry*. 2021. № 359. P. 29889. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129889>.
72. Arbutin alleviates diabetic symptoms by attenuating oxidative stress in a mouse model of type 1 diabetes / H. Li et al. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2021. № 41. 586–592. <https://doi.org/10.1007/s13410-021-00920-0>.
73. Sivasangari S., Asaikumar L., Vennila L. Arbutin prevents alterations in mitochondrial and lysosomal enzymes in isoproterenol-induced myocardial infarction: An in vivo study. *Hum. Exp. Toxicol.* 2021. № 40, Art. 100112. <https://doi.org/10.1177/0960327120945790>.
74. Arbutin ameliorates hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress and modulates adipocytokines and PPAR γ in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats / M. S. Abduh et al. *Life sciences*, 2023. № 321, Art. 121612. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121612>.
75. Hypoglycemic activity of *Pyrus bioessieriana* Buhse leaf extract and arbutin: Inhibitory effects on alpha amylase and alpha glucosidase / F. Yousefi et al. *J. Intern. Med.* 2013. № 4, P. 763. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294470/>.
76. Pharmacological Aspects of a Bioactive Compound Arbutin: A Comprehensive Review / B. Medha et al. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2023. № 2(13). P. 1-14. <https://doi.org/10.33263/BRIAC132.119>.

77. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin / M. Saeedi et al. *Phytotherapy research: PTR*. 2021. № 35(8), P. 4136–4154. <https://doi.org/10.1002/ptr.7076>.

78. Drug Discovery of Plausible Lead Natural Compounds That Target the Insulin Signaling Pathway: Bioinformatics Approaches / S. Shanak et al. *Based Complement Alternat Med*. 2022. № 2022. Art. 2832889. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/2832889>.

79. Can gallic acid potentiate the antihyperglycemic effect of acarbose and metformin? Evidence from streptozotocin-induced diabetic rat model / G. Oboh et al. *Archives of physiology and biochemistry*. 2022. № 128(3). P. 619–627. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1716014>.

80. Methyl gallate attenuates inflammation induced by Toll-like receptor ligands by inhibiting MAPK and NF-Kb signaling pathways / L. B. Correa et al. *Inflammation research*. 2020. № 69(12). P. 1257–1270. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01407-0>.

81. Gallic acid impairs fructose-driven de novo lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis via AMPK-dependent suppression of SREBP-1/ACC/FASN / Y. Lu et al. *Eur J Pharmacol*. 2023. № 940. P.175457. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175457>.

82. Deka H., Choudhury A., Dey B. K. An Overview on Plant Derived Phenolic Compounds and Their Role in Treatment and Management of Diabetes. *J Pharmacopuncture*. 2022. № 25(3). P. 199-208. <https://doi.org/10.3831/KPI.2022.25.3.199>.

83. Ong K. W., Hsu A., Tan B. K. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation. *Biochemical pharmacology*. 2013. № 85(9). P. 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>.

84. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review / S. Meng et al. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013. № 2013. Art. 801457. <https://doi.org/10.1155/2013/801457>.

85. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity / Alam M. A. et al. *Nutr Metab (Lond)*. 2016. № 13. P. 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>.

86. Use of Chlorogenic Acid against Diabetes Mellitus and Its Complications / Y. Yan et al. *J Immunol Res*. 2020. № 28. P. 9680508. <https://doi.org/10.1155/2020/9680508>.

87. Odia, A., & Esezobor, O. Z. (2017). Therapeutic Uses of Amino Acids. *InTech*. 294 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68932>.

88. L-Arginine Modulates Glucose and Lipid Metabolism in Obesity and Diabetes / H. Shengdi et al. *Curr Protein Pept Sci*. 2017. № 18(6). P. 599-608. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160627074017>.

89. Wolosowicz M., Prokopiuk S., Kaminski T. W. Recent Advances in the Treatment of Insulin Resistance Targeting Molecular and Metabolic Pathways: Fighting a Losing Battle? *Medicina*. 2022. № 58(4) P. 472. <https://doi.org/10.3390/medicina58040472>.

90. Arunkumar E., Achari S. K. l-Cysteine supplementation increases insulin sensitivity mediated by upregulation of GSH and adiponectin in high glucose treated 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017. № 630. P. 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.016>.

91. Lennicke C., Cochemé H. M. Redox regulation of the insulin signalling pathway. *Redox biology*. 2021. № 42, Art. 101964. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101964>.

92. Mennatallah A. A new approach in Type 2 diabetes mellitus treatment: Evaluation of the beneficial effect of L-cysteine in the treatment of type 2 diabetes mellitus (eBook) Seiten Anchor Academic Publishing (Verlag) 978-3-95489-853-4 (ISBN) 248 p.

93. N-acetyl-L-cysteine ameliorates gestational diabetes mellitus by inhibiting oxidative stress / P. Wang et al. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2022. № 10. Art. 1002/bab.2426. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/bab.2426>.

94. The phytochemical and chemotaxonomic study of *Salvia* spp. growing in Ukraine / O. Koshovyi et al. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2020. № 8 (3). P. 29–36. <http://doi.org/10.7324/jabb.2020.80306>.

95. The Investigation of the Stability of the Granules Based on Arginine and Tincture of Ginseng / K. Romas et al. *Journal of Global Pharma Technology*. 2020. № 12 (2). P. 108–114.

96. Research in Phytochemical Composition and Hypoglycemic Activity Screening of the Dry Extracts from Bearberry Leaves / N. Chaika, M. Mazen et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 3(31). P. 42–50. <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>.

97. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry / Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018. Kaunas, 2018. P. 40.

98. Компендіум 2019 — лікарські препарати / за ред. В.М. Коваленка – К.: МОПІОН, 2019. 2480 с.

99. Metformin ameliorates diabetes with metabolic syndrome induced changes in experimental rats / R. K. Suman et al. *International Journal of Biomedical Research*. 2016. № 7(2). P. 055-065.

100. Доклінічні дослідження лікарських засобів (Методичні рекомендації) / за ред. О. В. Стефанова – Київ: Авіценна, 2001. 528 с.

101. In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity / J.Y. Fang et al. *Nutrients*. 2019. № 11(3). P. 530. <http://doi.org/10.3390/nu11030530>.

102. Animal Models of Nutritional Induction of Type 2 Diabetes Mellitus / S. Barbosa-da-Silva et al. *Int. J. Morphol.* 2014, № 1(32). P. 279-293. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000100046>.

103. Загайко, А.Л., Брюханова, Т.О., & Шкапо, А.І. (2015). Модифікація методу моделювання експериментальної інсулінорезистентності у щурів:

Інформаційний лист Укрмедпатентінформу про нововведення в системі Охорони Здоров'я. № 86-2015, Київ.

104. Kravchenko G., Krasilnikova O., Mazen M. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats. *Медична та клінічна хімія*. 2020. № 1. С. 5–10.

105. Брюханова Т.О., Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Загайко .А.Л., Гаврилов І.О. Модифікація експериментальної методики відтворення інсулінорезистентності у щурів Інф. лист № 50-2020 - с.6.

106. Gingival Vein Punction: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice / D. T. de Oliveira et al. *J. of Laboratory Animal Sci.* 2009. № 2(36). P. 109–113.

107. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978. № 52. P. 302-310. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6).

108. Peg, R. J. Determination of conjugated dienes and trienes. In: Wrolstad, R, E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, (2001). pp. D2.1.1–D2.1.3.

109. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969. № 244(22). P. 6049-6055. PMID: 5389100.

110. Products of thiocyanate peroxidation: properties and reaction mechanisms / J. Tenovuo et al. *Biochim Biophys Acta.* 1986. № 870(3). P. 377-384. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90244-x](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(86)90244-x).

111. Hafeman D.G., Sunde R.A., Hoekstra W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.* 1974. № 104(5). P. 580-587. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/104.5.580>.

112. Moron M.S., Depierre J.W., Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim Biophys Acta.* 1979. № 582(1). P. 67-78. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(79\)90289-7](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(79)90289-7).

113. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples. *Analitical Chemistry*. 1959. № 31 (5). P. 964-966.
114. Kiernan J. Histological and histochemical methods: theory and practice. Jordan Hill, Oxford, UK: Linacre House; 1999. 94.
115. Bancroft J, Gamble, M. Theory and practice of histological techniques. London, UK: Churchill Livingstone; 2008. 433.]. Survana SK, Layton Ch, Banchroft JD (2013) Theory and practice of histological techniques. (7th edn), Churchill Livingstone, China.
116. Горбенко Н. І. Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти – фенсукциналу в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень (експериментальне дослідження). Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Харків, 2004. – 36 с
117. Lapach, S.M., Chubenko, A.V., Babich, P.M. Statistical methods in biomedical research using Excel. MORION, Kiiv, 2000. Ukraine. (in Ukrainian).
118. Kravchenko G., Matar M., Krasilnikova O. Screening of Bearberry leaves extracts hypoglycemic effect and study of acute toxicity. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 2 (55). С. 13-16. <https://doi.org/10.24959/ubphj.18.173>.
119. The Impact of Amino Acids on Postprandial Glucose and Insulin Kinetics in Humans: A Quantitative Overview / B. Van Sloun et al. *Nutrients*. 2020. № 12 (10). P. 3211. <http://dx.doi.org/doi.org/10.3390/nu12103211>.
120. Chadt A., Al-Hasani H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch*. 2020. № 472(9). 1273-1298. <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>.
121. Вивчення хімічного складу та фармакологічної активності сухого екстракту листя мучниці звичайної / Н.Б Чайка., О.М. Кошовий, М.А. Комісаренко, М. Матар, А.Б. Кравченко. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 30-31 березня 2017, м. Харків. в 2-х т. X.: НФаУ, 2017. Т. 2. С. 350-351.*

122. Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance / K. Sakaguchi et al. *Diabetol Int.* 2015. № 7(1). P. 53-58. <http://dx.doi.org/10.1007/s13340-015-0212-4>.

123 Habitual intake of dietary L-arginine in relation to risk of type 2 diabetes: a prospective study / P. Mirmiran et al. *BMC Endocr Disord.* 2021. № 21. P. 113. <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00774-x>.

124. Oral L-arginine stimulates GLP-1 secretion to improve glucose tolerance in male mice. / C. Clemmensen et al. *Endocrinology.* 2013. № 154(11). P. 3978-83. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1529>.

125. Amino acids differ in their capacity to stimulate GLP-1 release from the perfused rat small intestine and stimulate secretion by different sensing mechanisms / I. M. Modvig et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021. № 320. P. E874–E885. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00026.2021>.

126. Arunkumar E. A., Sushil K. J. l-Cysteine supplementation increases insulin sensitivity mediated by upregulation of GSH and adiponectin in high glucose treated 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2017. № 630. P. 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.016>.

127. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням амінокислот. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів*: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. 12-13 березня 2020, м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 334-336.

128. Test No. 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD. 2012. 1–14. <https://doi.org/10.1787/9789264071001>.

129. Chinedu E., Arome D., Ameh F. S. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology international.* 2013. № 20(3). P. 224–226. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.121674>.

130. Kravchenko G.B., Matar M. Study of Bearberry Leaves Polyphenol Extracts Acute Toxicity. V Національний з'їзд фармакологів України: тези

доповідей, 18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя. ВГО «Асоціація фармакологів України», 2017. С. 72-73.

131. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. / H. Yaribeygi et al. *Journal of cellular physiology*. 2019. № 234(6), P. 8152–8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>

132. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Study of bearberry leaves extracts hypoglycemic action under experimental insulin resistance in rats. *Клінічна фармація*. 2020. № 3 (24), С. 54-57. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>.

133. Chaimum-aom, N., Chomko, S., Talubmook, C. Toxicology and Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) of Thai Medicinal Plant Used for Diabetes control, *Phyllanthus acidus* L. (EUPHORBIACEAE). *Pharmacognosy Journal*. 2017. № 9 (1) 58–61. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.1.11>.

134. Li J.X., Cummins C.L. Fresh insights into glucocorticoid-induced diabetes mellitus and new therapeutic directions. *Nat Rev Endocrinol*. 2022. № 18(9). P. 540-557. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00683-6>.

135. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids / T. Kuo et al. *Adv Exp Med Biol*. 2015. № 872. P. 99-126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5.

136. Matar M., Kravchenko G.B. Effect of Bearberry Leaves Polyphenol Extract on Some Lipid Indices under Experimental Insulin Resistance. Ліки –людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф., 28-29 березня 2018 р., м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 13.

137. Berger C., Zdziebło D. Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2020. № 472, P. 1249–1272. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02383-4>.

138. Matar M. Hepatoprotective Effect of bearberry Leaves Extracts under Dexamethasone Induced Insulin Resistance in Rats. Topical Issues of Experimental and Clinical Biochemistry: International Scientific and Practical Conference, 01 October, 2021, Kharkiv, Ukraine. Х.: НФаУ, 2021. С. 271-272.

139. Matar M., Kravchenko G., Krasilnikova, O. Study of hepatoprotective effect of bearberry leaves extract under insulin resistance in rats. *EUREKA: Health Sciences*. 2021. № 6. P. 48-53. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.002174>.

140. Yoshida T., Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*. 2020. № 9(9). P. 1970. <https://doi.org/10.3390/cells9091970>.

141. Matar M. Comparative Study of Bearberry Polyphenol Concentrates Effects on Antioxidant Status under Experimental Insulin Resistance in rats. Collection of Abstracts of IV International Scientific-Practical Conference of Students and Young Scientists «Science and Medicine: a Modern View of Youth» Almaty, 20-21 April, 2017 P. 257.

142. Hyperglycemia enhances the generation of ROS and RNS that impair antioxidant power and cause oxidative damage in human erythrocytes / N. Qasim et al. *Biochemistry and cell biology*. 2023. № 101. P 64-76. <https://doi.org/10.1139/bcb-2022-0008>.

143. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats. *Медична та клінічна хімія*. 2020. № 1 (22). С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>.

144. Kravchenko G. B., Krasilnikova O. A., Matar M. The Effect of Polyphenol Administration on Plasma Lipid Composition under Experimental Insulin Resistance. Prospects for the Development of Medicine in EU Countries and Ukraine: International scientific and practical conference, 21–22 December 2018, Wloclawek, Republic of Poland. Wloclawek: Izdevnieciba «Baltija Publishing», 2018. P. 99-101.

145. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Матар М., Кравченко А.Б., Ковальова А.М., Кіреєв І.В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>.

146. Long-Term High-Fat High-Fructose Diet Induces Type 2 Diabetes in Rats through Oxidative Stress / Y. Zhao et al. *Nutrients*. 2022. № 14(11) P. 2181. <https://doi.org/10.3390/nu14112181>.

147. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications / I. Lozano et al. *Nutr Metab (Lond)*. 2016. № 13. Art. 15. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0074-1>.

148. Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction / P. Newsholme, et al. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2019. № 317. P. C420-C433. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00141.2019>.

149. Hurrell S., Hsu W.H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J*. 2017. № 40(5). P. 257-262. doi: 10.1016/j.bj.2017.06.007.

150. Role of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism-related diseases / J.Q. Huang et al. *Free Radic Biol Med*. 2018. № 127. P. 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.077>.

151. Sharma V. K., Singh T. G. Chronic Stress and Diabetes Mellitus: Interwoven

Pathologies. *Curr Diabetes Rev*. 2020. № 16(6). P. 546–556. <https://doi.org/10.2174/1573399815666191111152248>.

152. Petersen M. C., Shulman G. I. Mechanisms of Insulin Action, and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018. № 98(4). P. 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.

153. Hudish L. I., Reusch J. E., Sussel L. β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2019. № 129(10). P. 4001–4008. <https://doi.org/10.1172/JCI129188>.

154. Insulin Resistance: Review of the Underlying Molecular Mechanisms / H. Yaribeygi. *J Cell Physiol*. 2019. № 234(81). P. 52–61. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>.

155. Tsuchitani M., Sato J., Kokoshima H. A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals. *J Toxicol Pathol.* 2016. № 29(3). P. 147-154. <http://dx.doi.org/10.1293/tox.2016-0016>.
156. Esser, N., Utzschneider, K.M., Kahn, S.E. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. *Diabetologia.* 2020. № 63, P. 2007–2021. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05245-x>.
157. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues / E. Burgos-Morón et al. *J Clin Med.* 2019. № 8(9). P. 1385. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm8091385>.
158. The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes / N. Eguchi et al. *Int J Mol Sci.* 2021; № 22. P.1509. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041509>.
159. Radhakutty, A., Burt, M. G. Management of endocrine disease: Critical review of the evidence underlying management of glucocorticoid-induced hyperglycaemia. *European journal of endocrinology.* 2018. № 179(4). P. R207–R218. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0315>.
160. Pharmacological Aspects of a Bioactive Compound Arbutin: A Comprehensive Review / K. Manish et al. *Biointerface Research in Applied Chemistry.* 2023. № 2 (13). P. 1-14. <https://doi.org/10.33263/BRIAC132.119>.
161. A Role of Gallic Acid in Oxidative Damage Diseases: A Comprehensive Review / J. Gao et al. *Natural Product Communications.* 2019. № 14(8). <https://doi.org/10.1177/1934578X19874174>.
162. Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction / P. Newsholme et al. *American journal of physiology. Cell physiology.* 2019. № 317(3). P. 420–C433. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00141.2019>.
163. Changes in pancreatic histology, insulin secretion and oxidative status in diabetic rats following treatment with *Ficus deltoidea* and vitexin / S. Nurdiana et al.

BMC Complement Altern Med. 2017. № 17(1). P. 290. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1762-8>.

164. Zhang D.M., Jiao R.Q., Kong L.D. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients*. 2017. № 9(4). P. 335. <https://doi.org/10.3390/nu9040335>.

165. Kravchenko G., Krasilnikova O., Raal A., Matar M., Chaika N., Kireyev I., Grytsyk A., Koshovyi O. Arctostaphylos uva-ursi L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>.

166. Fructose metabolism and metabolic disease / S. A. Hannou et al. *Journal of clinical investigation*. 2018. № 28(2). P. 545–555. <https://doi.org/10.1172/JCI96702>.

167. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Мазен М. Вплив поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну на стан підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності. Двадцяті Данилевські читання. Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: збірник тез наук.-практ. конф. з онлайн-трансляцією 11 лютого 2021, м. Харків. ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», 2021. С. 34-35.

168. Boland B.B., Rhodes C.J., Grimsby J.S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Mol Metab.* 2017. № 6(9). P. 958-973. <https://doi.org/10.1016/j.molmet>.

169. Pathological mechanisms in diabetes of the exocrine pancreas: what's known and what's to know / Q. Wei et al. *Front Physiol.* 2020. № 28(11). P. 570276. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.570276>.

170. Glucose-induced β -cell dysfunction in vivo: evidence for a causal role of C-jun N-terminal kinase pathway / C. Tang et al. *Endocrinology*. 2018. № 159(11). P. 3643–3654. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00566>.

171. Khawandanah J. Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors. *Nutrition & diabetes*. 2019. № 9(1). Art. 33. <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0101-1>.

172. Nolan C. J., Prentki M. Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift. *Diabetes & vascular disease research*. 2019. № 16(2). P. 118–127. <https://doi.org/10.1177/1479164119827611>.

173. Antidiabetic bioactive compounds from plants / F. Missoun et al. *Medical Technologies Journal*. 2018. № 2 (2). P. 199–214. <https://doi.org/10.26415/2572-004x-vol2iss2p199-214>.

174. Natesan V., Kim S. J. Lipid Metabolism, Disorders and Therapeutic Drugs - Review. *Biomol Ther (Seoul)*. 2021. № 29(6). P. 596-604. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.122>.

175. Tomkin G. H., Owens D. Diabetes and dyslipidemia: characterizing lipoprotein metabolism. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2017. № 10. P. 333-343. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S115855>.

176. Wang K., Ahmadizar F. (2021). Lipids Abnormality and Type 2 Diabetes Mellitus: Causes and Consequences. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.96592.

177. Natesan V., Kim S. J. Lipid Metabolism, Disorders and Therapeutic Drugs - Review. *Biomol Ther (Seoul)*. 2021. № 29(6). P. 596-604. doi: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.122>.

178. Kaludercic N., Fabio Di L. Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2020. № 7. Art. 12. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00012>.

179. Amelioration of Endothelial Dysfunction in Diabetes: Role of Takeda G Protein-Coupled Receptor 5 / Z. Cai et al. *Front Pharmacol*. 2021. № 12. P. 637051. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.637051>.

180. Sujana B., Ghosh A. The association of oxidative stress biomarkers with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Health science reports* vol. 2021. № 4. Art. e389. <https://doi.org/10.1002/hsr2.389>.

181. Prevalence of elevated liver enzymes and its association with type 2 diabetes: A cross-sectional study in Bangladeshi adults / Islam S. et al. *Endocrinol Diabetes Metab.* 2020. № 3(2). P. e00116. <https://doi.org/10.1002/edm2.116>.

182. Zhang D. M., Jiao R. Q., Kong L. D. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 2017. № 9(4). Art. 335. <https://doi.org/10.3390/nu9040335>.

183. A Review on Oxidative Stress, Diabetic Complications, and the Roles of Honey Polyphenols / V. R. Pasupuleti et al. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2020. Art. 23. 8878172. <https://doi.org/10.1155/2020/8878172>

184. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review / U. Asmat et al. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ.* 20162 № 4(5). P. 547-553. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.

185. Achari A. E., Jain S. K. l -Cysteine supplementation increases insulin sensitivity mediated by upregulation of GSH and adiponectin in high glucose treated 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2017. № 630. P. 54-65. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.016>.

186. Potential roles of psychological and oxidative stress in insulin resistance: a cohort-based study / M. Janczura et al. *Diabetology & metabolic syndrome.* 2020. № 12. P. 58. <http://doi.org/10.1186/s13098-020-00566-8>.

187. Lipotoxicity and β Cell Maintenance in Obesity and Type 2 Diabetes / R. Ye et al. *Journal of the Endocrine Society.* 2019. № 3(3), P. 617–631. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00372>.

188. Mechanisms and Treatment of Dyslipidemia in Diabetes / E. Bahiru et al. *Current cardiology reports.* 2021. № 23(4) 26. Art. 2. <https://doi.org/10.1007/s11886-021-01455-w>.

189. Prevention of Oxidative Stress-Induced Pancreatic Beta Cell Damage by Broussonetia Kazinoki Siebold Fruit Extract Via the ERK-Nox4 Pathway / H.J. Kim et al. *Antioxidants (Basel).* 2020. № 9(5). P. 406. <https://doi.org/10.3390/antiox9050406>.

190. Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. 2015. *Diabetologia*. № 58(2). P. 221-232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>.
191. Mukai E., Fujimoto S., Inagaki N. Role of Reactive Oxygen Species in Glucose Metabolism Disorder in Diabetic Pancreatic β -Cells. *Biomolecules*. 2022. № 12(9). P. 1228. <https://doi.org/10.3390/biom12091228>.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Kravchenko G. B., Matar M., Krasilnikova, O. A. Screening of Bearberry leaves extracts hypoglycemic effect and study of acute toxicity. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 2 (55). С. 13-16. <https://doi.org/10.24959/ubphj.18.173>. (Особистий внесок – брав участь в проведенні експерименту, узагальненні результатів експерименту та підготовці статті).
2. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Study of bearberry leaves extracts hypoglycemic action under experimental insulin resistance in rats. *Клінічна фармація*. 2020. № 3 (24), С. 54-57. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
3. Kravchenko G.B., Krasilnikova O.A., Matar M. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats. *Медична та клінічна хімія*. 2020. № 1 (22). С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
4. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Матар М., Кравченко А.Б., Ковальова А.М., Кіреєв І.В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).

Продовж. Дод. А

5. Chaika N., Matar M., Koshovyi O., Kravchenko G., Goryacha O., Kireyev I., Kovalenko S., Darmograi R. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. №3 (31). 2021. P. 42-50. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>. (**Scopus**). (Особистий внесок – брав участь в проведенні експерименту та узагальненні його результатів).
6. Matar M., Kravchenko G., Krasilnikova, O. Study of hepatoprotective effect of bearberry leaves extract under insulin resistance in rats. *EUREKA: Health Sciences*. 2021. № 6. P. 48-53. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.002174>.
7. Kravchenko G., Krasilnikova O., Raal A., Matar M., Chaika N., Kireyev I., Grytsyk A., Koshovyi O. Arctostaphylos uva-ursi L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>. (**Scopus**). (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження щодо одержання екстрактів та вивчення їх хімічного складу, статистична обробка результатів, підготовлено статтю до друку).
8. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід 124043 Україна, № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27.4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).
9. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на кор. мод. 142210 Україна, № u 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020; Бюл. № 10. 4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).

Продовж. Дод. А

10. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О.А., Мазен М., Чайка Н.Б. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13.4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).
11. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № а2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку та проведенні експерименту).
12. Kravchenko G.B., Matar M. Study of Bearberry Leaves Polyphenol Extracts Acute Toxicity. V Національний з'їзд фармакологів України: тези доповідей, 18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя. ВГО «Асоціація фармакологів України», 2017. С. 72-73.
13. Кравченко Г.Б., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів рослин сімейства вересових на моделі експериментальної інсулінорезистентності. Міжнародна науково-практична конференція «Медичні науки: історія розвитку, сучасний стан та перспективи досліджень»: збірник тез наукових робіт учасників, 22-23 вересня 2017 р., м. Львів. ГО «Львівська медична спільнота», 2017. С. 59-61.
14. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Матар М., Кравченко А.Б. Вивчення хімічного складу та фармакологічної активності сухого екстракту листя мучниці звичайної. I міжнар. наук.-практ. конф. «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»: матеріали, 30-31 березня 2017, м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2017. Т. 2. С. 350-351.

Продовж. Дод. А

15. Matar M. Comparative Study of Bearberry Polyphenol Concentrates Effects on Antioxidant Status under Experimental Insulin Resistance in rats. IV International Scientific-Practical Conference of Students and Young Scientists «Science and Medicine: a Modern View of Youth»: Collection of Abstracts of Almaty, 20-21 April, 2017 P. 257.
16. Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry. Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018. Kaunas, 2018. P. 40.
17. Kravchenko G. B., Krasilnikova O. A., Matar M. The Effect of Polyphenol Administration on Plasma Lipid Composition under Experimental Insulin Resistance. Prospects for the Development of Medicine in EU Countries and Ukraine: International scientific and practical conference, 21–22 December 2018, Wloclawek, Republic of Poland. Wloclawek: Izdevnieciba «Baltija Publishing», 2018. P. 99-101.
18. Matar M., Kravchenko G.B. Effect of Bearberry Leaves Polyphenol Extract on Some Lipid Indices under Experimental Insulin Resistance. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф., 28-29 березня 2018 р., м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 13.
19. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Матар М. Вивчення гіпоглікемічної активності екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням амінокислот. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. 12-13 березня 2020, м. Харків. в 2-х т. Х.: НФаУ, 2020. Т. 2. С. 334-336.

Продовж. Дод. А

20. Кравченко Г.Б., Красільнікова О.А., Мазен М. Вплив поліфенольних екстрактів з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну на стан підшлункової залози на тлі експериментальної інсулінорезистентності. Двадцяті Данилевські читання. Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: збірник тез наук.-практ. конф. з онлайн-трансляцією 11 лютого 2021, м. Харків. ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», 2021. С. 34-35.
21. Matar M. Hepatoprotective Effect of bearberry Leaves Extracts under Dexamethasone Induced Insulin Resistance in Rats. Topical Issues of Experimental and Clinical Biochemistry: International Scientific and Practical Conference, 01 October, 2021, Kharkiv, Ukraine. X.: НФаУ, 2021. С. 271-272.

Додаток Б

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня

1. V Національний з'їзд фармакологів України (м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р., форма участі – публікація тез);
2. Міжнародна науково-практична конференція «Медичні науки: історія розвитку, сучасний стан та перспективи досліджень» (м. Львів, 22-23 вересня 2017 р., форма участі – публікація тез);
3. I міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 30-31 березня 2017 р., форма участі – публікація тез);
4. IV International Scientific-Practical Conference of Students and Young Scientists «Science and Medicine: a Modern View of Youth» (Almaty, 20-21 April, 2017, форма участі – публікація тез);
5. International Scientific and Practical Conference «Prospects for the Development of Medicine in EU Countries and Ukraine» (Wloclawek, Republic of Poland, 21–22 December 2018, форма участі – публікація тез);
6. II міжнародної науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 28-29 березня 2018 р., форма участі – публікація тез);
7. 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy «Sciences and Practice 2018» (Kaunas, Lithuania, 09 November, 2018, форма участі – публікація тез);
8. IV міжнародної науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 12-13 березня 2020 р., форма участі – публікація тез);

Продовж. Дод. А

9. науково-практичній конференції «Двадцяті Данилевські читання. «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (м. Харків, 11 лютого 2021 р. форма участі – публікація тез);
10. International Scientific and Practical Conference «Topical Issues of Experimental and Clinical Biochemistry» (Kharkiv, Ukraine, 01 October, 2021, усна доповідь).



Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії» (01 жовтня 2021 р., Харків, Україна)	
ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ СЕРПНУ А4 В КРОВІ У ЦУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ КОЛІТОМ <i>Бабенко Ольга В'ячеславівна</i> Харківський національний медичний університет, Харків, Україна кафедра біологічної хімії	
ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ІНІТІАТОРІВ JNK У КОРЕКЦІЇ ТОКСИЧНИХ УРАЖЕНЬ ПЕЧІНКИ <i>Григор'єва Оксана Анатоліївна</i> , канд. біол. наук Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна доцент кафедри біологічної хімії	
FAMILY ERICACEAE AS SOURCE OF NOVEL ANTI-DIABETIC MEDICATIONS <i>Кравченко Ганна Борисівна</i> , канд. біол. наук Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна, доцент кафедри біологічної хімії	
ЕФЕКТИ МОДУЛЯТОРІВ ОБМІНУ СФІНГОЛІПІДІВ НА ВМІСТ КАРБОЛІПІДІВ У ТКШІНАХ СТАРИХ ЦУРІВ <i>Сторожко Галина Назарівна</i> , канд. біол. наук Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна, асистент кафедри біологічної хімії	
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТЕРАПІЯ РЕПРОДУКТОНАТІЙ У ПАСІДІОК ПРОСТАТИТУ: БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ <i>Коренко С.М.</i> , канд. біол. наук Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків, Україна старший науковий співробітник лабораторії репродуктивної ендокринології	
HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF BEARBERRY LEAVES EXTRACTS UNDER DEXAMETHASONE INDUCED INSULIN RESISTANCE IN RATS <i>Matar Mazen</i> Beita Pharma Industries, Beirut, Lebanon Medical representative	
BIOCHEMICAL RESEARCH QUALITY ASSURANCE BY VALIDATION: AN EXAMPLE OF AMMONIA DETERMINATION IN BIOLOGICAL LIQUIDS <i>Протасюк Вікторія Володимирівна</i> , канд. фарм. наук Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна доцент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації	
ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ У ГІПОТІРЕОЇДНИХ ЦУРІВ ЗА ДІЇ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛОДІВ ФЕЙХОА <i>Китовенко Лізавета Іванівна</i> , канд. фарм. наук Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна доцент кафедри нормальної та патологічної фізіології	
ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ ТА СПИРТОВОЇ НАСТОЯНКИ ПЕТРАРІСЛАДСЬКОЇ НА МЕТАБОЛІЗМ КЛІКІВ У ЦУРІВ ЗА УМОВ МЕРКАЗОЛІЛІНДУКОВАНОГО ГІПОТІРЕОЗУ <i>Щербак Олена Анатоліївна</i> , канд. фарм. наук Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна доцент кафедри біологічної хімії	

Додаток В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора з наукової роботи
ДУ "Інститут проблем ендокринної патології
ім. В.Я. Данилевського НАМН України",
д. мед. н. професор

М.Р. Микитюк

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування екстрактів з листя Мучниці звичайної у якості лікувально-профілактичного гіпоглікемічного засобу.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра біологічної хімії, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, аспірант Матар Мазен, доцент Кравченко Ганна Борисівна.

3. **Джерела інформації:**

1. Kravchenko G.B. The Study of Hypoglycemic Action of Extracts from Bearberry Leaves Under the Experimental Insulin Resistance in Rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen // Клінічна фармація. – Т. 24, № 3. – 2020. – С. 40-46. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>.
2. Kravchenko G.B. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen // Медична та клінічна хімія. - 2020. - Т. 22. № 1. – С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>.
3. Chaika N. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves / N. Chaika, M. Mazen, O. Koshovyi, G. Kravchenko, et al. // ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2021.- Т. 3 (31). - С. 42–50. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>.

Де впроваджено: у наукову діяльність Інституту, з метою розв'язання актуальних проблем клінічної та експериментальної медицини.

Термін впровадження: травень 2021 р.

4. **Результати впровадження:** використання результатів у науковій діяльності Інституту дозволяє розширити знання про фармакологічні ефекти сухих екстрактів, отриманих з листя Мучниці звичайної та екстрактів, які модифіковані шляхом додавання амінокислот та їхнього застосування у комплексній профілактиці стану інсулінорезистентності та цукрового діабету 2 типу.

5. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні відділу експериментальної фармакології і токсикології ДУ "Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України".

Протокол № 3 від «3» листопада 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувачка відділу експериментальної
фармакології і токсикології,
завідувачка лабораторії біохімічних
досліджень, доктор біол. наук, професор

 Н. І. Горбенко

Подовж дод. В



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Запорізького
державного медичного університету,
професор

В. О. Туманський
2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування екстрактів з листя Мучниці звичайної у якості лікувально-профілактичного гіпоглікемічного засобу.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра біологічної хімії, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, аспірант Матар Мазен, доцент Кравченко Ганна Борисівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Kravchenko G.B. The Study of Hypoglycemic Action of Extracts from Bearberry Leaves Under the Experimental Insulin Resistance in Rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen // Клінічна фармація. – Т. 24, № 3. – 2020. – С. 40-46. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>.
 2. Kravchenko G.B. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen / Медична та клінічна хімія. - 2020. - Т. 22, № 1. – С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>

Де впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри біологічної хімії Запорізького державного медичного університету.

Термін впровадження: червень 2021 р.

4. **Результати впровадження:** використання результатів у науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання про фармакологічні ефекти сухих екстрактів, отриманих з листя Мучниці звичайної та екстрактів, які модифіковані шляхом додавання амінокислот та їхнього застосування у комплексній профілактиці стану інсулінорезистентності та цукрового діабету 2 типу.

5. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.
Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної хімії Запорізького державного медичного університету.

Протокол № 31 від «08» червня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувачка кафедри біологічної хімії
доктор хімічних наук, професор

К. В. Александрова

Подовж дод. В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи та інновацій
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця
д.мед.н., професор Земсков С. В.



2021 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування екстрактів з листя Мучниці звичайної у якості лікувально-профілактичного засобу гіпоглікемічної дії.
 2. **Установа розробник, її поштова адреса:** Національний фармацевтичний університет, кафедра біологічної хімії, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
 3. **Автор розробки:** аспірант Матар Мазен, доцент Кравченко Ганна Борисівна
 4. **Джерела інформації:**
 1. Kravchenko G.B. The Study of Hypoglycemic Action of Extracts from Bearberry Leaves Under the Experimental Insulin Resistance in Rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen // Клінічна фармація. – Т. 24, № 3. – 2020. – С. 40-46. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>.
 2. Kravchenko G.B. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen / Медична та клінічна хімія. - 2020. - Т. 22. № 1. - С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>
 5. **Місце впровадження:** кафедра фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця
 6. **Термін впровадження:** з «01» травня 2021 р. по «23» червня 2021 р.
 7. **Ефективність впровадження:** використання результатів у науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання про фармакологічні ефекти сухих екстрактів, отриманих з листя Мучниці звичайної та екстрактів, які модифіковані шляхом додавання амінокислот та їхнього застосування у комплексній профілактиці метаболічного синдрому, інсулінорезистентності та цукрового діабету 2 типу.
 8. **Використання розробки** показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, які наведені у джерелах інформації.
 9. **Зауваження, пропозиції:** немає.
- Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, протокол № 28 від «23» червня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
доцент кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця,
к.фарм.н.,

Ходаківська О. В.

Завідувачка кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця,
д.мед.н., професор

Зайченко Г. В.

Подовж дод. В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Тернопільського національного медичного

університету Імені І.Я.Горбачевського

д.біол.н. проф. Кліщ І.М.

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування екстрактів з листя Мучниці звичайної у якості лікувально-профілактичного гіпоглікемічного засобу.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра біологічної хімії, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, аспірант Матар Мазен, доцент Кравченко Ганна Борисівна.

3. **Джерела інформації:**

1. Чайка Н.Б. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя / Н.Б. Чайка, О.М. Кошовий, Матар Мазен, А.Б. Кравченко, А.М. Ковальова, І.В. Кірсєв // Український біофармацевтичний журнал. - № 1(66). - 2021. - С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>.
2. Kravchenko G.B. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen / Медична та клінічна хімія. - 2020. - Т. 22. № 1. - С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i1.10936>

Де впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри фармації факультету післядипломної освіти Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

Термін впровадження: 2021 р.

4. **Результати впровадження:** використання результатів у науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання про фармакологічні ефекти сухих екстрактів, отриманих з листя Мучниці звичайної та екстрактів, які модифіковані шляхом додавання амінокислот та їхнього застосування у комплексній профілактиці стану інсулінорезистентності та цукрового діабету 2 типу.

5. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармації факультету післядипломної освіти Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

Протокол № 9 від « 24 » червня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувачка кафедри фармації факультету
післядипломної освіти
доктор біологічних наук, професор



Л.С. Фіра

Подовж дод. В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного медичного
університету, професор

В. Д. Марковський

« » 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування екстрактів з листя Мучниці звичайної у якості лікувально-профілактичного гіпоглікемічного засобу.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра біологічної хімії, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, аспірант Матар Мазен, доцент Кравченко Ганна Борисівна.

3. **Джерела інформації:**

1. Kravchenko G.B. The Study of Hypoglycemic Action of Extracts from Bearberry Leaves Under the Experimental Insulin Resistance in Rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen // Клінічна фармація. – Т. 24, № 3. – 2020. – С. 40-46. <https://doi.org/10.24959/cphj.20.1527>.
2. Kravchenko G.B. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of arginine containing bearberry leaves extract in insulin resistant rats / G.B. Kravchenko, O.A. Krasilnikova, M. Mazen / Медична та клінічна хімія. - 2020. - Т. 22. № 1. – С. 5-10. <https://doi.org/10.11603/mech.2410-681X.2020.v.i1.10936>

Де впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету.

Термін впровадження: травень 2021 р.

4. **Результати впровадження:** використання результатів у науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання про фармакологічні ефекти сухих екстрактів, отриманих з листя Мучниці звичайної та екстрактів, які модифіковані шляхом додавання амінокислот та їхнього застосування у комплексній профілактиці стану інсулінорезистентності та цукрового діабету 2 типу.

5. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету.

Протокол № 17 від «29» серпня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувачка кафедри біологічної хімії
доктор медичних наук, професор

О.А. Наконечна

Подовж дод. В



Подовж дод. В



Подовж дод. В



Подовж дод. В

