

**БЕЗАЛКАЛОЇДНА ФРАКЦІЯ ЕКСТРАКТУ
КОЗЛЯТНИКА ЛІКАРСЬКОГО (*Galega officinalis* L.)
ПОПЕРЕДЖАЄ ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС В УМОВАХ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

М. І. ЛУПАК, М. Р. ХОХЛА, Г. Я. ГАЧКОВА, О. П. КАНЮКА,
Н. І. КЛИМИШИН, Я. П. ЧАЙКА, М. І. СКИБІЦЬКА, Н. О. СИБІРНА

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Досліджено вплив безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) на процес утворення активних форм кисню та стан прооксидантно–антиоксидантної рівноваги в крові щурів в умовах експериментального цукрового діабету. Встановлено, що безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського попереджає розвиток оксидативного стресу в щурів за стрептозотоцинового діабету, забезпечуючи мобілізацію антиоксидантних механізмів захисту системи крові. У разі введення цього екстракту тваринам із досліджуваною патологією відбувається зниження рівня генерації активних форм кисню в лейкоцитах, пригнічується процес окисної модифікації протеїнів і ліпідів, а активність ключових ензимів антиоксидантної системи захисту (супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза) в периферичній крові щурів підвищується. Встановлений біологічний ефект можна пояснити наявністю в складі екстракту біологічно активних речовин з антиоксидантними властивостями (фітолу та флавоноїдів).

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет, безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.), оксидативний стрес.

Хронічна гіперглікемія за цукрового діабету (ЦД) є основним патогенетичним чинником розвитку діабетичних ускладнень. На фоні гіперглікемії активується низка метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення активних форм кисню (АФО), насамперед супероксид-аніона ($O_2^{\cdot-}$), який, взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на високореакційноздатний гідроксил-радикал (HO^{\cdot}), синглетний кисень (O_2^1), пероксид гідрогену (H_2O_2) та пероксинітрит ($ONOO^-$) [1].

$ONOO^-$ – надзвичайно цитотоксична сполука, яка безпосередньо або опосередковано може взаємодіяти з низкою молекул у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції та спричинюючи розвиток оксидативно-нітративного стресу. При цьому пероксинітрит інтенсивно модифікує протеїни, нітруючи їх за залишками тирозину, інтенсифікуються процеси пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), утворюються розриви ДНК [2, 3]. У відповідь на

ушкодження ДНК АФО та $ONOO^-$ активується репараційний комплекс, до складу якого входить ензим полі(ADP-рибозо)полімераза. Цей ензим рибозилує низку протеїнів ядра та ензим гліколізу гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (ГАФДГ) [4]. Внаслідок інгібування ГАФДГ надлишок глюкози включається в альтернативні шляхи метаболізму, що призводить до активації поліолового і гексозоамінового шляхів, накопичення продуктів та попередників неензиматичного глікозилювання й активації протеїнкази С [5].

Активация зазначених механізмів в умовах гіперглікемії та надпродукції $O_2^{\cdot-}$ значно посилює оксидативно-нітративний стрес і призводить до виникнення хронічних діабетичних уражень [3, 5].

Оксидативний стрес спричинює активацію імункомпетентних клітин крові та їх агрегацію і адгезію. При цьому в активованих лейкоцитах відбувається підвищення синтезу арахідонової кислоти та її метаболітів, цитокінів, кисневих

радикалів, секреція лізосомальних ензимів, що зрештою призводить до розвитку атеросклерозу [6].

Активация лейкоцитів зумовлює структурні і функціональні зміни в еритроцитах, зокрема посилення пероксидного окислення мембранних ліпідів і лізис клітин, зміни структурних протеїнів еритроцитарної мембрани, що супроводжується зниженням здатності еритроцитів до деформації. Крім цього, у разі підвищеної концентрації вільних радикалів еритроцити швидко пошкоджуються, що пов'язано з високим вмістом в них гемоглобіну та кисню, який є потужним промотором оксидативного стресу [7].

Враховуючи основні патогенетичні механізми, що беруть участь у розвитку хронічних ускладнень ЦД, обґрунтованим терапевтичним підходом їх лікування та профілактики є використання препаратів з антиоксидантною дією. Застосування антиоксидантів спрямовано на нейтралізацію АФО, що призводить до розблокування ГАФДГ і посилення обміну глюкози гліколітичним шляхом.

Лікарські рослини з високим вмістом біологічно активних речовин можуть слугувати основою для створення лікарських препаратів та функціональних харчових продуктів з антидіабетичною дією.

Перспективною рослинною сировиною, яку можна використати для розробки антидіабетичних фітопрепаратів є *Galega officinalis* L. (козлятник лікарський, галега лікарська). Газохроматографічний аналіз компонентного складу екстракту цієї рослини дав змогу ідентифікувати низку біологічно активних речовин з потенційною цукрознижуючою дією (фітол (3,68%), етиловий естер пальмітинової кислоти (10,9%), фітостероли (кампестерол (1,97%) та стігмастерол (14,72%), похідні хіназоліну (2,89%)) та з антиоксидантною дією (фітол (3,68%) та флавоноїди (2,98%)) [8–12].

Нашими попередніми дослідженнями доведено виражену цукрознижуючу дію безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (БФ ЕКЛ). Із джерел літератури відомо, що антигіперглікемічний ефект відомих антиоксидантних препаратів реалізується через зниження інтенсивності вільнорадикального окислення [13]. Фітонутрієнти з антиоксидантними властивостями здатні скавенджерувати

вільні радикали, пригнічувати утворення АФО шляхом модуляції активності низки ензимів, серед яких ксантинооксидаза, циклооксигеназа, ліпооксигеназа, мікросомна монооксигеназа, NADH-оксидаза, покращувати функціональний стан ендогенної антиоксидантної системи (АОС), збалансовувати прооксидантно-антиоксидантну рівновагу та запобігати окисному ушкодженню різних компонентів клітини [14].

Метою роботи було виявити антиоксидантний коригуючий вплив БФ ЕКЛ в умовах експериментального цукрового діабету (ЕЦД) за показниками, що характеризують ступінь розвитку оксидативного стресу (рівень АФО, продукти окисної модифікації протеїнів та ліпідів, активність ензимів АОС – супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГПЮ)) – і дають змогу оцінити ступінь окисного ушкодження компонентів системи крові.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях із масою тіла 100–150 г. Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води і перебування в стандартних умовах віварію (12-годинна зміна світла і темряви). Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001). Тварин було поділено на 4 групи по 9 тварин у кожній: перша – контроль, друга – контрольні тварини, яким вводили БФ ЕКЛ (контроль+БФ ЕКЛ), третя – тварини з ЕЦД, четверта – тварини з ЕЦД, яким вводили БФ ЕКЛ (ЕЦД+БФ ЕКЛ). ЕЦД індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину (Sigma, США) в дозі 5,5 мг на 100 г маси тіла. Стрептозоточин розчиняли в 10 мМ цитратному буфері (рН 5,5). Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, яку визначали глюкозооксидазним методом із використанням набору реактивів (Філісіт-Діагностика, Україна) на 3-тю та 14-ту добу після введення стрептозотоцину. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози більше 14 мМ (після 18-годинного голодування). Тваринам 2- та 4-ї груп (через два тижні після індукції діабету) *per os* вводили БФ ЕКЛ у вигляді водної емульсії в дозі 0,6 г фітопрепарату (за сухим залишком) на 1 кг їхньої маси тіла впродовж 14 діб. Об'єм введеної емульсії становив 1 мл на одну тварину. Мето-

дики одержання та стабілізації БФ ЕКЛ, а також аналіз її компонентного складу опубліковано у наших попередніх роботах [15–17].

Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом після припинення введення БФ ЕКЛ. Об'єктом досліджень були лейкоцити, еритроцити та плазма крові щурів. Забір крові для досліджень здійснювали з додаванням гепарину (гепарин: цільна кров, 1 : 100). Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугування крові при 1700 г протягом 5 хв і тричі промивали охолодженим фізіологічним розчином, після чого гемолізували дистильованою водою.

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові в градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho = 1,076\text{--}1,078 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$) шляхом центрифугування при 567 г (35 хв). Після центрифугування відбирали кільце лейкоцитів, яке утворювалося на межі двох рідин. Одержані клітини двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) ($\text{pH} = 7,4$) впродовж 5 хв при 850 г. Життєздатність клітин у тесті із трипановим синім становила не менше 98% [18].

Продукцію АФО в лейкоцитах крові вимірювали, використовуючи 2',7'-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетат (7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) (H2DCF-DA, Fluka), який після окислення перетворювався у флуоресціюючий 2',7'-дихлорофлуоресцеїн (DCFH). Лейкоцити ($2\cdot 10^6$ клітин) ресуспендували у буферному розчині (10 мМ HEPES/NaOH, $\text{pH} = 7,4$), 140 мМ NaCl і 2,5 мМ CaCl₂) та інкубували з H2DCF-DA в концентрації 3 мкМ впродовж 45 хвилин при температурі 37 °С. Клітини промивали у буферному розчині. Зразки аналізували на флуоресцентному мікроскопі Nikon Optiphot 2 (Nikon, Японія). Для фіксації зображення використовували відеокамеру для мікроскопа (DCM310). Інтенсивність флуоресценції 2',7'-дихлорофлуоресцеїну (довжина хвилі збудження – 515 нм, емісії 535 нм) виражали в умовних одиницях (у.о.). Для аналізу та обробки зображень використовували програму Image J 1.47t.

Активність СОД (1.15.1.11) визначали методом, який ґрунтується на відновленні блідо-жовтого барвника нітросинього тетразолію до темно-фіолетового формазану [19]. Активність каталази (1.11.1.6) розраховували за інтенсивністю забарвлення комплексу, який утворюється за взаємодії H₂O₂ з молібдатом амонію [20]. Активність ГПО (1.11.1.9) встанов-

лювали за швидкістю окислення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутілу [21]. Оцінку окисного ушкодження різних компонентів клітини здійснювали за вмістом продуктів окисної модифікації протеїнів (ОМП) та ліпідів. Вміст карбонільних груп протеїнів визначали за реакцією взаємодії альдегідних і кетонних груп аліфатичних амінокислот із 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо-і кетопохідні нейтрального характеру реєстрували при 370 нм, а основного характеру – при 430 нм [22]. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) досліджували за реакцією утворення забарвленого триметинового комплексу з тіобарбітуровою кислотою [23]. Концентрацію протеїну визначали загальноприйнятим методом Лоурі. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Дані представляли у вигляді $M \pm m$. Статистично значущими вважали дані за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Розвиток ЦД супроводжувався значним підвищенням базального рівня продукції АФО в лейкоцитах щурів, що у 3,7 раза перевищує контрольні значення (рис. 1, А, Б). У забезпеченні окисно-відновної рівноваги крові важливу роль відіграють поліморфноядерні лейкоцити, які здатні генерувати АФО. Згідно з даними літератури лейкоцити мають три ензиматичні системи генерації АФО: мембранозв'язану NADPH-оксидазу, пероксидази – мієлопероксидазу в нейтрофілах та еозинофіліну пероксидазу в еозинофілах, а також NO-синтазу [12]. Активність цих ензиматичних систем і порушення функціонування компонентів АОС призводить до збільшення рівня АФО в лейкоцитах.

У разі введення БФ ЕКЛ виявлено зниження рівня АФО в лейкоцитах контрольних тварин (на 29,8% порівняно з контролем) та в умовах ЕЦД (у 2,5 раза порівняно з тваринами з діабетом). Ці результати підтверджують антиоксидантну дію досліджуваного екстракту (рис. 1, А, Б).

Внаслідок зростання вмісту АФО в клітині відбувається інтенсифікація вільнорадикального окислення біосубстратів. Модифікацію протеїнів за дії АФО досліджували за утворенням додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот. Відомо, що деградовані протеїни

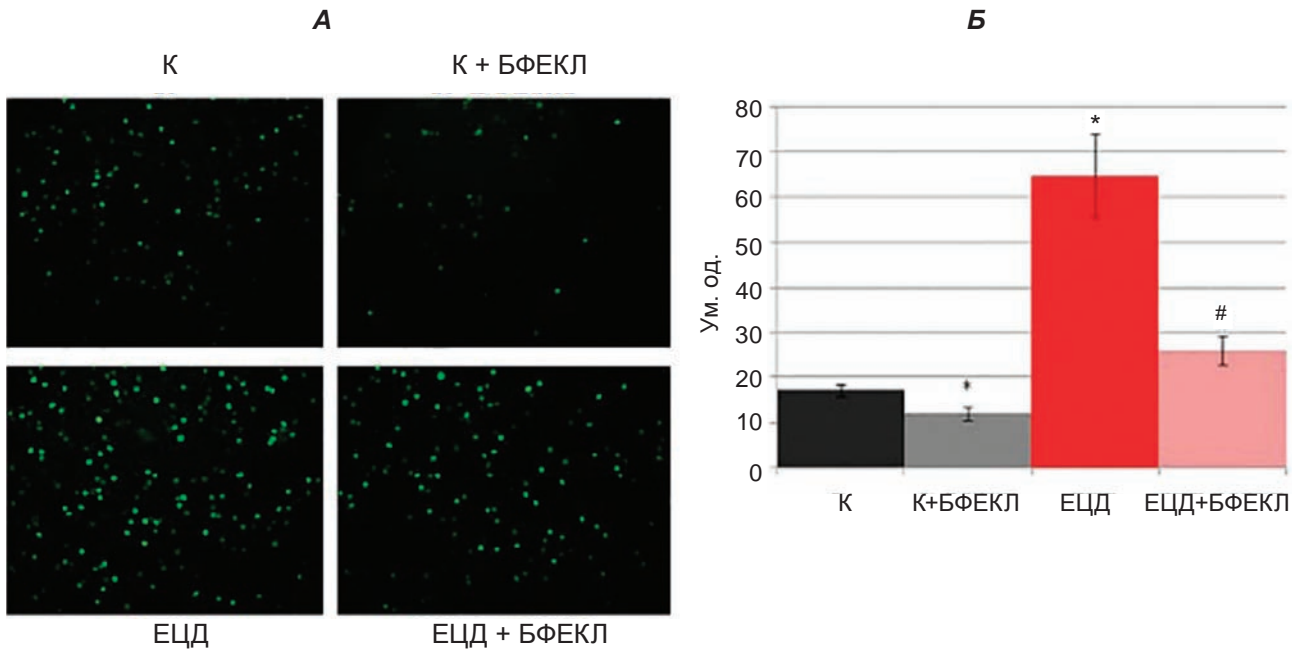


Рис. 1. А – мікрофотографії лейкоцитів периферичної крові щурів ($\times 40$); Б – оцифровані дані мікрофотографій відображають рівень генерації АФО в цих клітинах, який оцінювали за інтенсивністю флуоресценції 2',7'-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату. Тут і на рис. 2, 3 і в таблиці: * різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # різниця вірогідна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

можуть знаходитися в клітинах декілька годин і навіть днів. З огляду на це, окислені протеїни вважають відносно стабільними показниками оксидативного стресу за багатьох патологічних станів, зокрема за діабету та його ускладнень, що має важливе значення в клінічній практиці [12, 24].

За діабету встановлено зростання вмісту продуктів ОМП нейтрального та основного характеру в плазмі крові (у 2,6 та 2,9 раза відповідно) та в лейкоцитах щурів (у 2,3 та 3,4 раза відповідно) (рис. 2). Залежно від інтенсивності генерації АФО, ступінь ОМП може бути різним: від поодиноких пошкоджень амінокислотних залишків – до агрегації та фрагментації молекул протеїнів. У ході ОМП змінюється їхня гідрофобність, ізоелектрична точка, термостабільність, підвищується чутливість до протеолізу та знижується ензиматична активність. Карбонільні інтермедіати (гліоксал, метилгліоксал та 3-деоксиглюкозон) здійснюють окисне глікозилювання протеїнів, утворюючи кінцеві продукти неензиматичного глікозилювання, які можуть слугувати джерелом АФО [25].

За введення БФ ЕКЛ хворим тваринам знижувався вміст продуктів ОМП нейтрального характеру в лейкоцитах і плазмі крові на 31,9 і 65,7% та основного характеру на 48,4 і 69,0% із наближенням вмісту до рівня фізіологічних значень. У групі здорових тварин антиоксидантна дія досліджуваного екстракту виражена меншою мірою, ніж в умовах ЕЦД (рис. 2).

Встановлено зростання вмісту ТБК-АП у лейкоцитах та плазмі крові щурів з ЕЦД відповідно у 2,6 та 1,8 раза порівняно з контролем (рис. 3). Продукти ПОЛ діють на протеїни як сильні окислювачі, і, таким чином, можуть посилювати процеси ОМП [24].

ПОЛ є критичним для цілісності функціонування клітини, оскільки відбувається переважно в мембранах. Відомо, що посилення процесів ПОЛ у клітинних мембранах призводить до потовщення або деструкції ліпідного бішару, зменшення площі протеїн-ліпідних контактів, порушення функціональної активності протеїнів, в тому числі ензимів, зміни проникності мембрани та поверхневого заряду, порушення функціонального стану мембрано-рецепторного комплексу. Накопичення

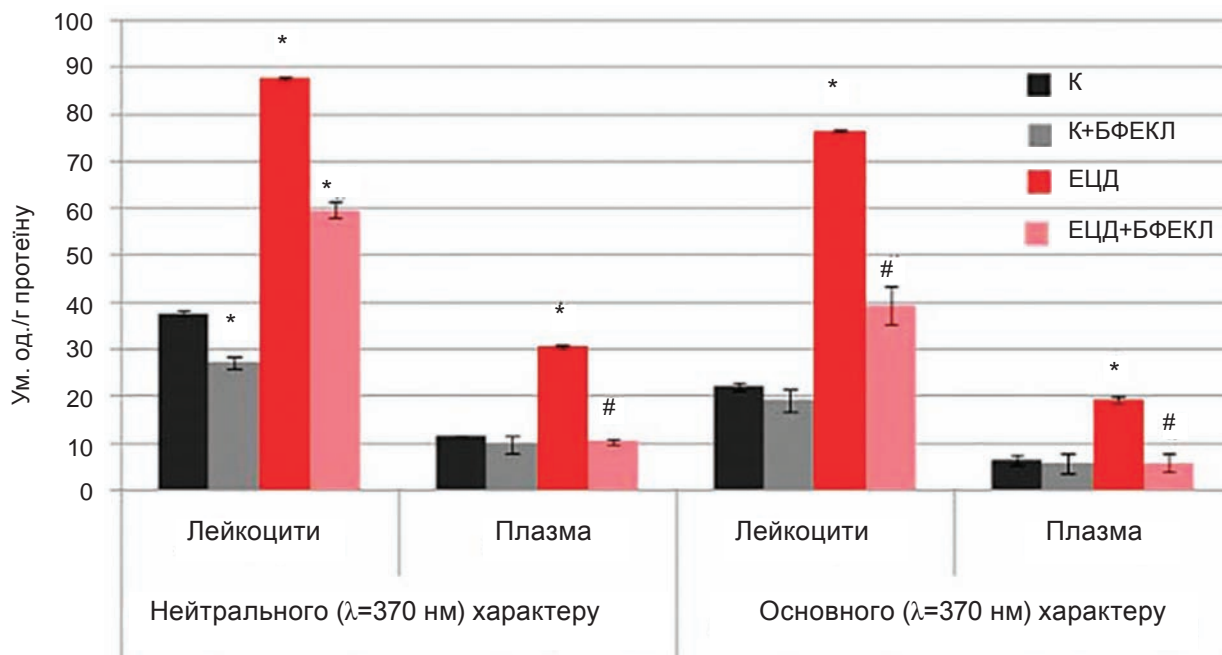


Рис. 2. Вміст продуктів окисної модифікації протеїнів у лейкоцитах та плазмі крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та у разі введення БФ ЕКЛ

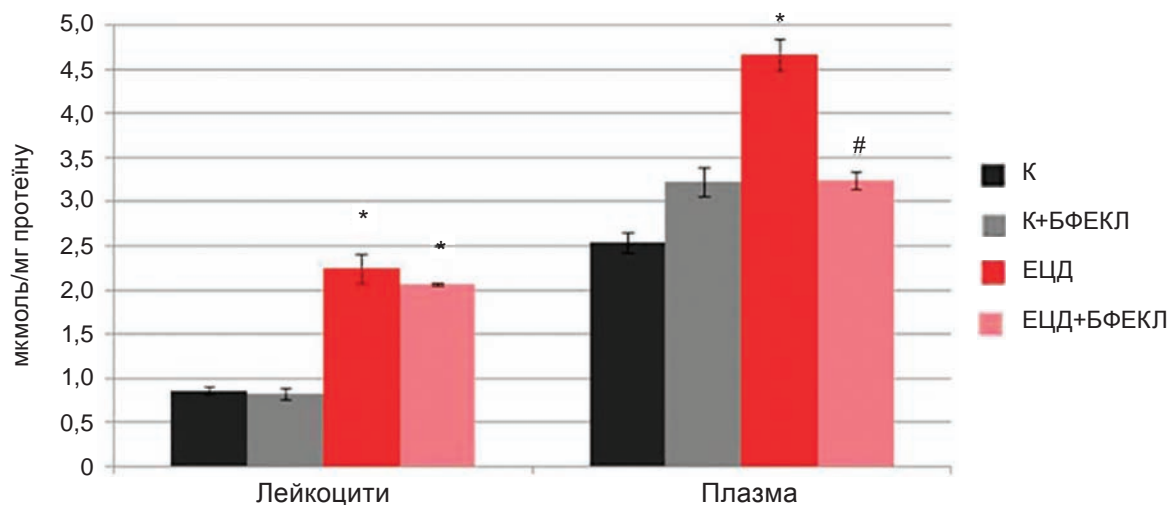


Рис. 3. Вміст ТБК-активних продуктів у лейкоцитах і плазмі крові щурів у нормі, в умовах ЕЦД та за введення БФ ЕКЛ

продуктів вільнорадикального окислення призводить до змін фізико-хімічних характеристик мембран клітин крові, що відображається на реологічній властивості цієї біологічної рідини [26].

Дія БФ ЕКЛ спрямована на зниження інтенсивності накопичення продуктів ПОЛ у лейкоцитах і плазмі тварин контрольної групи

та хворих на ЦД, проте її вплив на ці процеси виражений меншою мірою, ніж на ОМП.

Способи захисту клітинних ліпідів і протеїнів від окисної модифікації суттєво відмінні. Цілісність мембрани ефективно захищають ліпопероксидази та низькомолекулярні антиоксиданти внаслідок чого пероксиди ліпідів швидко метаболізуються, тоді як відновлення

окислених протеїнів практично не відбувається [27–29].

Застосування БФ ЕКЛ за ЦД сприяло мобілізації антиоксидантних механізмів захисту системи крові. Основними діючими компонентами екстракту, які виявляють антиоксидантні властивості є: фітол [8, 17] та флавоноїди [12, 17].

In vitro було показано, що фітол, який входить до складу БФ ЕКЛ, виявляє антиоксидантні властивості, зумовлені наявністю у складі молекули гідроксильної групи [8]. Доповнюють антиоксидантну дію екстракту флавоноїди, котрі слугують пасткою електронів та вільних радикалів, а отже здатні пригнічувати ланцюгові реакції вільнорадикального окислення біосубстратів [12].

Негативній дії АФО в організмі протистоїть АОС, функціонування якої спрямовано на нейтралізацію вільних радикалів, а також на репарацію спричинених ними ушкоджень [12, 30].

Недостатність синтезу інсуліну за ЦД 1-го типу може бути причиною змін антиоксидантного статусу організму. На експериментальних моделях стрептозотоцин- та алоксаніндукованого діабету щурів було показано зниження активності Cu-Zn-СОД в печінці, нирках, еритроцитах і перитонеальних макрофагах та каталази в аорті і перитонеальних макрофагах [31]. Припускають, що гормони, зокрема інсулін, можуть змінювати активність ензиматичних антиоксидантів у клітинах. Підтвердженням цього є той факт, що у разі інкубації перитонеальних макрофагів у середовищі з інсуліном

(1 Од/мл) підвищувалася активність СОД, каталази та ГПО, недостатність інсуліну призводила до зниження активності цих антиоксидантів [32].

Аналіз одержаних результатів свідчить про неспроможність антиоксидантної системи клітин крові реалізувати в повному обсязі захисно-адаптаційні механізми в умовах оксидативного стресу. Активність СОД, каталази та ГПО знижувалася в лейкоцитах та еритроцитах щурів у разі стрептозотоцинового діабету (таблиця). Причиною інактивації ензимів за цієї патології може бути глікозилювання ензимів. Глюкоза зв'язується з аміногрупами кінцевих амінокислот або ε-аміногрупами лізину. У разі введення БФ ЕКЛ тваринам контрольної групи в лейкоцитах підвищувалася активність каталази (на 19,5%) та ГПО (на 32,5%), натомість в еритроцитах збільшувалася лише активність СОД (на 33,7%). Після введення екстракту тваринам з ЕЦД показано вірогідне зростання активності СОД (на 47,1%) і каталази (на 23,4%) в лейкоцитах та ГПО (на 25,5%) – в еритроцитах.

Таким чином, в умовах ЕЦД БФ ЕКЛ у дозі 0,6 г/кг здійснює протекторну дію щодо ключових компонентів системи антиоксидантного захисту організму. Підвищення активності ензимів АОС у разі введення БФ ЕКЛ тваринам з ЕЦД узгоджується з результатами пригнічуючої дії цього екстракту на процеси утворення АФО та окислювальної модифікації протеїнів і ліпідів.

Протекторний ефект БФ ЕКЛ на клітини крові в умовах ЦД ми пояснюємо його здатністю регулювати прооксидантно-антиоксидантну

Активність окремих ензимів системи антиоксидантного захисту в клітинах крові в нормі, в умовах ЕЦД та за введення БФ ЕКЛ

Тип клітин	Умови експерименту			
	К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
<i>Активність СОД, У/мг протеїну</i>				
Лейкоцити	266,0 ± 23,5	266,5 ± 14,6	206,5 ± 24,8*	390,1 ± 26,7 [#]
Еритроцити	15,1 ± 0,6	20,2 ± 1,4*	6,5 ± 0,5*	8,1 ± 0,7
<i>Активність каталази, нмоль H₂O₂/хв×мг протеїну</i>				
Лейкоцити	3,46 ± 0,20	4,3 ± 0,2*	2,75 ± 0,2*	3,59 ± 0,2 [#]
Еритроцити	5,18 ± 0,50	3,78 ± 0,37	3,06 ± 0,30 *	4,03 ± 0,25
<i>Активність ГПО, мкмоль G-SH/хв×мг протеїну</i>				
Лейкоцити	49,9 ± 1,0	66,1 ± 1,8*	30,5 ± 1,7*	36,1 ± 2,6
Еритроцити	15,6 ± 1,4	17,4 ± 1,3	10,8 ± 0,3*	14,5 ± 1,2 [#]

рівновагу шляхом скавенджерування вільних радикалів та запобігання інгібування ключових компонентів ензиматичної ланки АОС.

**БЕЗАЛКАЛОИДНАЯ ФРАКЦИЯ
ЭКСТРАКТА ГАЛЕГИ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*Galega
officinalis* L.) ПРЕДУПРЕЖДАЕТ
ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ
ДИАБЕТЕ**

*М. И. Лупак, М. Р. Хохла, Г. Я. Гачкова,
О. П. Канюка, Н. И. Клымышин,
Я. П. Чайка, М. И. Скибицкая,
Н. А. Сибирная*

Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Исследовано влияние безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.) на процесс образования активных форм кислорода и состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови крыс в условиях экспериментального сахарного диабета. Установлено, что безалкалоидная фракция экстракта галеги лекарственной предупреждает развитие оксидативного стресса у крыс в условиях стрептозотоцинового диабета, обеспечивая мобилизацию антиоксидантных механизмов защиты системы крови. При введении экстракта животным с исследуемой патологией происходит снижение уровня генерации активных форм кислорода в лейкоцитах, угнетение процессов окислительной модификации протеинов и липидов, а также повышается активность ключевых ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) в периферической крови крыс. Установленный биологический эффект можно объяснить наличием в составе экстракта биологически активных веществ, которые обладают антиоксидантными свойствами (фитол и флавоноиды).

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, безалкалоидная фракция экстракта галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.), оксидативный стресс.

**THE ALKALOID-FREE FRACTION
FROM *Galega officinalis* EXTRACT
PREVENTS OXIDATIVE STRESS
UNDER EXPERIMENTAL DIABETES
MELLITUS**

*M. I. Lupak, M. R. Khokhla, G. Ya. Hachkova,
O. P. Kanyuka, N. I. Klymyshyn,
Ya. P. Chajka, M. I. Skybitska, N. O. Sybirna*

Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

The effect of alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract on the process of formation of reactive oxygen species and indicators of prooxidant-antioxidant balance was investigated in rat peripheral blood under conditions of experimental diabetes mellitus. It was shown that alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract prevents oxidative stress development in rats with streptozotocin-induced diabetes, providing antioxidant and antiradical mobilization mechanisms to protect the blood system. In the case of extract application to animals with studied pathology, one can observe a reducing effect of reactive oxygen species generation in leukocytes, inhibition of proteins and lipids oxidative modification processes and increased activity of key enzymes of rat peripheral blood antioxidant system (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase). The revealed biological effect could be explained by the presence of biologically active substances with antioxidant properties in the extract composition (phytol and flavonoids).

Key words: experimental diabetes, alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract, oxidative stress.

References

1. Lee H. B, Ha H., King G. L. Reactive oxygen species and diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14(3):209-210.
2. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007;87(1):315-424.
3. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-1625.

4. Schmitz H. Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. *Eur. J. Cell. Biol.* 2001;80(6):419-427.
5. Drel V. R. Main mechanisms of the initiation and development of diabetic complications: the role of nitrative stress. *Studia Biologica.* 2010;4(2):141-158. (In Ukrainian).
6. Kozlovskyy V. Y., Akulenok A. V. Leukocyte activation, role in endothelial damage and in development of cardiovascular disease. *Vestnyk VHMU.* 2005;4(2):5-13. (In Russian).
7. Baskurt O. K., Meiselman H. J. Activated polymorphonuclear leukocytes affect red blood cell aggregability. *J. Leukoc. Biol.* 1998;63(1):89-93.
8. de Menezes Patrício Santos C. C., Salvadori M. S., Mota V. G., Costa L. M., de Almeida A. A. C., Lopes de Oliveira G. A., Costa J. P., de Sousa D. P., de Freitas R. M., de Almeida R. N. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. *Neurosci. J.* 2013;2013:1-9.
9. Sarkodie J. A., Fleischer T. C., Edoh D. A., Dickson R. A., Mensah M. L. K., Annan K., Woode E., Koffour G. A., Appiah A. A., Brew-Daniels H. Antihyperglycaemic activity of ethanolic extract of the stem of *Adenia lobata* Engl (Passifloraceae). *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2013;4(4):1370-1377
10. Lee Y. M., Haastert B., Scherbaum W., Hauner H. A phytosterol-enriched spread improves the lipid profile of subjects with type 2 diabetes mellitus. A randomized controlled trial under free-living conditions. *Eur. J. Nutr.* 2003;42(2):111-117.
11. Ram V. J., Farhanullah, Tripathi B., Srivastava A. Synthesis and antihyperglycemic activity of suitably functionalized 3H-quinazolin-4-ones. *Bioorg. Med. Chem.* 2003;11(11):2439-2444.
12. Zenkov N. K., Lankin V. Z., Menshikova E. B. Oxidative stress. M.: Science, 2001. 343 p. (In Russian).
13. Derymedvid' L. V., Bukhtiarova I. P. The investigation of angioprotective hypoglycohaemic properties of recombinant superoxide dismutase in ditizonovy diabetes in rabbits. *Exp. Clinic. Med.* 2006;1:17-20. (In Ukrainian).
14. Uma M. M., Sudarsanam D. Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Res. Pharm.* 2011;1(4):28-37.
15. Khokhla M., Kleveta G., Chajka Ya., Skybitska M., Sybirna N. Cytological and biochemical characteristics of rats' peripheral blood under the condition of experimental diabetes mellitus type 1 and Galega officinalis admission. *Studia Biologica.* 2012;6(1):3-46. (In Ukrainian).
16. Khokhla M., Kleveta G., Lupak M., Kaniuka O., Chajka Ya., Skybitska M., Sybirna N. Studies of Galega officinalis extract component. *Visn. Lv. Uni. Ser. Biol.* 2013;62:55-60. (In Ukrainian).
17. Lupak M., Khokhla M., Hachkova G., Shulga O., Sheglova N., Vildanova R., Zyn A., Sybirna N. Application of biogenic surfactants for alkaloid-free fraction from Galega officinalis extract stabilization. *Studia Biologica.* 2015;9(1):5-16. (In Ukrainian).
18. Lapovets L., Lutsyk B. Laboratory immunology. K.: Aral, 2004. 173 p. (In Ukrainian).
19. Chevary S., Andyal T., Shtrenger Ya. Determination of antioxidant properties of blood and its diagnostic value in the elderly. *Lab. Delo.* 1991;(10):9-13. (In Russian).
20. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G. Method for Determining the Activity of Catalase. *Lab. Delo.* 1988;(1):16-18. (In Russian).
21. Moin V. M. Simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Lab. Delo.* 1986;(12):124-126. (In Russian).
22. Meshchysheh I. The determining method of proteins oxidative modification. *Bukov. Med. Visnyk.* 1999;1:196-205. (In Ukrainian).
23. Temirbulatov R. A., Seleznev Ye. I. A method for increasing intensity of free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value. *Lab. Delo.* 1981;(4):209-211. (In Russian).
24. Dubinina E. E., Pustygina A. V. Oxidative modification of proteins, its role in pathologic states. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2008;80(6):5-18. (In Russian).
25. Evans J. L., Goldfine I. D., Maddux B. A., Grodsky G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2002;23(5):599-622.
26. Muravleva L. E., Molotov-Luchanskiy V. B., Klyuyev D.A., Kultanov B. J., Tankibayeva N. A., Kusainova D. S., Tuleshova A. M., Kaliyeva G. T. Investigation of the erythrocytes oxidative

- metabolism in blood of patients with diabetic nephropathy. *Mod. High Techn.* 2009;4:14-17. (In Russian).
27. Stadtman E. R., Oliver C. N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 1991;266(4):2005-2008.
 28. Das N., Levine R. L., Orr W. C., Sohal R. S. Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 2001;360(1):209-216.
 29. Lushchak V. I., Bagnyukova T. V., Lushchak O. V. Indices of oxidative stress. TBA-reactive substances and carbonylproteins. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2004;76(3):136-141. (In Ukrainian).
 30. Tsydendambayev P. B., Khyshiktuyev B. S., Nikolayev S. M. Biological effects of flavonoids. *Bull. East Siber. Scient. Cent. SB RAMS.* 2006;6(52):229-233. (In Russian).
 31. Atalay V., Laaksonen D. E., Niskanen L. Altered antioxidant enzyme defenses in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta. Physiol. Scand.* 1997;161:195-201.
 32. Pereira B., Costa Rosa L. F. B. P., Safi D. A. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 1995;50:2093-2098.

Отримано 26.02.2015