

**М. І. Лупак, О. П. Канюка, Г. Я. Гачкова, Я. П. Чайка, М. І. Скибіцька, Н. О. Сибірна**  
Львівський національний університет імені Івана Франка

## **ВПЛИВ БЕЗАЛКАЛОЇДНОЇ ФРАКЦІЇ ЕКСТРАКТУ КОЗЛЯТНИКА ЛІКАРСЬКОГО НА СИСТЕМУ L-АРГІНІН/NO В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ**

*Досліджено вплив безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського на NO-синтазний шлях метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД) 1 типу. Введення його тваринам з ЕЦД чинить позитивний коригувальний вплив на організм, знижуючи надпродукцію оксиду азоту шляхом інгібування активності NO-синтази.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** козлятник лікарський, цукровий діабет 1 типу, лейкоцити, L-аргінін, NO-синтаза.

**ВСТУП.** Цукровий діабет 1 типу є поліфакторним метаболічно-автоімунним захворюванням. Автоімунні процеси, які зумовлюють прогресуючу деструкцію  $\beta$ -клітин підшлункової залози, індукуються цитокінами та посилюються внутрішньоклітинними медіаторами, зокрема оксидом азоту (NO), супероксид-аніоном ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксидом водню ( $H_2O_2$ ). NO є унікальною сигнальною молекулою, яка виступає внутрішньоклітинним та позаклітинним месенджером, нейротрансмітером і регулятором внутрішньоклітинної секреції. В організмі людини і тварин NO утворюється двома основними шляхами: ензиматичним і неензиматичним. Ензиматичний синтез NO здійснюється з участю ензиму NO-синтази (NOS, 1.14.13.39), який за наявності молекулярного кисню та NADPH-H<sup>+</sup> каталізує перетворення амінокислоти L-аргініну до NO і L-цитруліну [1].

При цукровому діабеті 1 типу внаслідок активації прозапальними цитокінами (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1, ІЛ-6 та ін.) у багатьох типах клітин, зокрема в лейкоцитах, відбуваються експресія гена індуцибельної NO-синтази та надмірне утворення NO. Кінцеві продукти метаболізму NO посилюють цитотоксичну дію лейкоцитів периферичної крові, пошкоджують ендотелій судин, порушують гемодинаміку та спричиняють тканинну дезорганізацію [1, 2].

У комплексному лікуванні цукрового діабету актуальним є використання препаратів рослин-

ного походження. Біологічна активність лікарських рослин визначається наявністю в їх складі сполук різноспрямованої дії, які проявляють широкий спектр біологічних ефектів. До лікарських рослин, які мають виражену цукрознижувальну дію та використовуються у клінічній діабетології, належить *Galega officinalis* L. (галега лікарська, козлятник лікарський).

Метою даної роботи було дослідити вплив безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (БФЕКЛ) на NO-синтазний шлях обміну L-аргініну в лейкоцитах щурів з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД).

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 100–150 г. Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води і перебування у стандартних умовах (12-годинна зміна світла і темряви). ЕЦД індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину ("Sigma", США) в дозі 5 мг на 100 г маси тіла. Тварин було поділено на 4 групи: 1-ша – контроль; 2-га – контроль+БФЕКЛ; 3-тя – ЕЦД; 4-та – ЕЦД+БФЕКЛ. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, яку визначали через 72 год після введення стрептозотоцину глюкозооксидазним методом із застосуванням набору реактивів ("Філісіт-Діагностика", Україна). В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози понад 14 мМ. Щурам 2-ї та 4-ї груп (на 3-й день з моменту індукції діабету) протягом 14 днів *per os* вводили БФЕКЛ.

© М. І. Лупак, О. П. Канюка, Г. Я. Гачкова, Я. П. Чайка, М. І. Скибіцька, Н. О. Сибірна, 2014.

Безалкалоїдну фракцію екстракту козлятника лікарського отримували згідно з протоколом, який описано раніше [5]. Через два тижні після індукції цукрового діабету щурам раз на добу *per os* вводили БФЕКЛ у вигляді водної суспензії, у дозі 0,6 г на 1 кг маси тіла тварини, в об'ємі 1 мл упродовж 14 діб.

Лейкоцити виділяли у градієнті густини фікол – тріомбразт ( $\rho = 1,076\text{--}1,078 \text{ г/см}^3$ ) [6]. Вміст нітритів та нітратів визначали згідно з методикою [9], сумарну активність NO-синтази – спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з реактивом Грісса [7], концентрацію L-аргініну – за допомогою реакції Сакагучі [11], концентрацію білка – відповідно до загальноприйнятого методу Лоурі [10]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Статистично значущими вважали дані при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** У лейкоцитах щурів з ЕЦД відбувається активація окисного метаболізму L-аргініну. Зростання сумарної активності NO-синтази (в 1,6 раза) супроводжувалося збільшенням продукції оксиду азоту, про що свідчило підвищення вмісту стабільних метаболітів NO – нітрит-аніонів (у 1,6 раза) та нітрат-аніонів (у 3,83 раза) порівняно з контролем. Вміст нітрит-аніонів у плазмі крові значною мірою відображає активність NO-синтази ендотеліальних клітин, зокрема, 90 % всіх нітритів плазми є стабільними ме-

таболітами оксиду азоту NO-синтазного походження [8]. За умов ЕЦД у лейкоцитах периферичної крові щурів зростає вміст L-аргініну (у 2,8 раза щодо контролю), що може бути зумовлено посиленням розпадом протеїнів в організмі як одним із проявів порушення метаболізму при інсуліновій недостатності за умов цукрового діабету [3].

У тварин контрольної групи в разі введення БФЕКЛ було виявлено вірогідне підвищення концентрації L-аргініну (в 1,3 раза) у лейкоцитах периферичної крові, а також незначне зростання сумарної активності NO-синтази та вмісту нітрит- і нітрат-аніонів.

При ЕЦД на фоні введення БФЕКЛ відмічено зниження концентрації L-аргініну в 1,5 раза та сумарної активності NO-синтази в 1,3 раза, а також сумарного вмісту стабільних метаболітів NO в 1,3 раза щодо контролю (табл.). Обмін L-аргініну в організмі може здійснюватися шляхом окисного перетворення з участю NO-синтази (до NO та L-цитруліну) і неокисного – з участю аргінази (до сечовини та орнітину). Зменшення вмісту L-аргініну в лейкоцитах щурів з ЕЦД на фоні зниження активності NO-синтази може бути наслідком порушення надходження його до клітини або активації аргінази. Співвідношення між NO-синтазним та аргіназним шляхами метаболізму L-аргініну підтримує у клітинах фізіологічний пул цієї амінокислоти і визначає інтенсивність продукування NO та його метаболітів.

Таблиця – Вплив БФЕКЛ на концентрацію L-аргініну, вміст стабільних метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази в лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД ( $M \pm m$ ,  $n=10\text{--}15$ )

Показник	Група			
	контроль	контроль+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
Аргінін, мкмоль/мг білка	10,01±0,87	13,19±0,56*	28,09±2,3**	17,75±1,9##
Сумарний вміст метаболітів NO, мкмоль/мг білка	18,21±3,83	25,14±3,66	68,67±5,53**	49,61±5,9
NO <sup>2-</sup> , мкмоль/мг білка	0,45±0,043	0,47±0,035	0,72±0,02*	0,54±0,059
NO <sup>3-</sup> , мкмоль/мг білка	17,76±3,75	24,66±3,56	67,94±5,5**	49,07±5,83#
NOS, нмоль NO <sup>2-</sup> /хв · мг білка	6,99±1,09	8,84±0,31	11,21±0,8*	8,45±0,48#

Примітки:

1. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

2. # – різниця вірогідна порівняно з діабетом,  $p < 0,05$ .

**ВИСНОВКИ.** За умов ЕЦД підвищується концентрація вільного L-аргініну та відбувається інтенсифікація шляху окисного метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів, що експериментально підтверджується зростанням активності NOS.

Введення БФЕКЛ тваринам з ЕЦД чинить позитивний коригувальний вплив на організм,

знижуючи надпродукцію NO. Встановлений біологічний ефект досліджуваного екстракту ми пояснюємо наявністю у його складі сполук, які проявляють антиоксидантну дію і, таким чином, здатні пригнічувати утворення активних форм кисню та азоту [4].

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вплив агматину на метаболізм L-аргініну в еритроцитах крові за умов стрептозотонін-індукованого діабету в щурів / І. Ференц, І. Бродяк, М. Люта [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 3. – С. 55–62.
2. Профіль прозапальних цитокінів при цукровому діабеті 1-го типу / Ю. Кияк, Н. Фартушок, Ю. Онищук [та ін.] // Фізіол. журн. – 2012. – № 5. – С. 65–69.
3. Старостина Е. Г. Диабетический кетоацидоз и гиперосмолярное состояние при сахарном диабете. Основные подходы к терапии / Е. Г. Старостина // В мире лекарств. – 1999. – № 3. – С. 24–28.
4. Хохла М. Дослідження компонентного складу екстракту козлятника лікарського / М. Хохла, Г. Клевета, М. Лупак // Вісник Львів. ун-ту, Серія біологічна. – 2013. – Вип. 62. – С. 55–60.
5. Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської / М. Хохла, Г. Клевета, Я. Чайка [та ін.] // Біологічні студії / *Studia Biologica*. – 2012. – № 6(1). – С. 37–46.
6. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow, with special reference to factors which influence and modify sedimentation properties of hematopoietic cells / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – **21** (Suppl.) – P. 1–109.
7. Dawson J. A microtiter-plate assay of nitric oxide synthase activity / J. Dawson, R. G. Knowles // *Mol. Biotechnol.* – 1999. – **12**, № 3. – P. 275–279.
8. Groves J. T. Nitric oxide synthase: models and mechanisms / J. T. Groves, C. C-Y. Wang // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2000. – **4**, № 6. – P. 687–695.
9. Miranda K. A. Rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite / K. A. Miranda // *Nitric Oxide*. – 2001. – **5**, № 1. – P. 62–71.
10. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, №1. – P. 265–275.
11. Weber C. A Modification of Sakaguchi's Reaction for the Quantitative Determination of Arginine / C. J. Weber // *J. Biol. Chem.* – 1930. – **86**. – P. 217.

**М. І. Лупак, О. П. Канюка, Г. Я. Гачкова, Я. П. Чайка, М. І. Скибицкая, Н. О. Сибирная**  
*Львовский национальный университет имени Ивана Франко*

### **ВЛИЯНИЕ БЕЗАЛКАЛОИДНОЙ ФРАКЦИИ ЭКСТРАКТА ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НА СИСТЕМУ L-АРГИНИН/NO В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА**

#### **Резюме**

*Исследовано влияние безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной на NO-синтазный путь метаболизма L-аргинина в лейкоцитах периферической крови крыс в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭСД) 1 типа. Введение его животным с ЭСД оказывает положительное корректирующее влияние на организм, снижая сверхпроизводство оксида азота (NO) путем ингибирования активности NO-синтазы.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** галега лекарственная, сахарный диабет 1 типа, лейкоциты, L-аргинин, NO-синтаза.

**М. І. Lupak, О. Р. Kanyuka, Н. Ya. Hachkova, Ya. P. Chaika, М. І. Skybitska, Н. О. Sybirna**  
*IVAN FRANKO LVIV NATIONAL UNIVERSITY*

### **INFLUENCE OF ALKALOID-FREE FRACTION OF *GALEGA OFFICINALIS* EXTRACT ON L-ARGININE/NO SYSTEM OF RATS LEUKOCYTES UNDER THE EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 1**

#### **Summary**

*The effects of the alkaloid-free fraction of Galega officinalis extract (AFF GOE) on NO-synthase metabolic pathway of L – arginine was investigated in peripheral blood leukocytes of rats under conditions of experimental diabetes mellitus (EDM) type 1. Application of alkaloid-free fraction of Galega officinalis extract (AFF GOE) under EDM reveals a positive corrective effect on the organism, reducing the production of nitric oxide (NO) by inhibiting the activity of NO-synthase.*

**KEY WORDS:** *Galega officinalis*, diabetes mellitus type 1, leukocytes, L-arginine, NO-synthase.

*Отримано 04.08.14*

**Адреса для листування:** М. І. Лупак, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна.