

ВОДНІ ЕКСТРАКТИ ТА СУСПЕНЗІЇ ЯКОНА РЕГУЛЮЮТЬ ВМІСТ ФРАГМЕНТОВАНОЇ ДНК І БІЛКІВ РЕГУЛЯТОРІВ АПОПТОЗУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

О. Горбулінська¹, М. Хохла¹, Л. Міщенко², Н. Сибірна¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: aleksaa82@gmail.com

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна

У статті охарактеризовані особливості впливу водних екстрактів листя й кореневих бульб і суспензій корневих бульб якона на апоптоз лейкоцитів периферичної крові здорових тварин та тварин з експериментальним цукровим діабетом. Встановлено, що за умов гіперглікемії індукція апоптичних процесів у лейкоцитах супроводжується порушенням кількісного співвідношення протеїнів регуляторів апоптозу (p53, Bcl-2) та збільшенням ступеня фрагментації ДНК. При введенні водного екстракту листя та суспензій корневих бульб якона тваринам з експериментальним цукровим діабетом виявлено їхній пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель клітин. Про це свідчать нормалізація вмісту фрагментованої ДНК та співвідношення білків регуляторів апоптозу. Водночас водний екстракт корневих бульб за умов досліджуваної патології не виявляє впливу на вміст білків p53 та Bcl-2. Встановлений позитивний коригуючий вплив водного екстракту листя та суспензій корневих бульб якона можна пов'язати з наявністю у їхньому складі поліфенолів, представлених протокатеховою, хлорогеновою, кавовою, феруловою (сліди), розмариновою кислотами та їхніми похідними і незамінною амінокислотою – триптофаном, що відомі своїми потужними антиоксидантними властивостями.

Ключові слова: якон (*Smallanthus sonchifolia* Poerr. & Endl.), цукровий діабет, апоптоз, лейкоцити.

Хронічна гіперглікемія – основний маркер цукрового діабету (ЦД), супроводжується підвищенням швидкості автоокиснення глюкози з подальшим збільшенням кількості вільних радикалів і розвитком оксидативного стресу й утворенням продуктів, що виявляють потужну проапоптичну дію [14].

На сьогодні фітотерапія стала важливою складовою частиною в лікуванні хворих на ЦД та базується на таких основних принципах: нормалізація обміну вуглеводів, покращення реологічних властивостей крові, пригнічення апоптозу і стимуляція регенерації β-клітин.

Особливої уваги в розробці рослинних препаратів заслуговує рослина родини айстрових (*Asteraceae*) – якон (*Smallanthus sonchifolia* Poerr. & Endl.). Відомо, що екстракти цієї рослини мають цукрознижувальну дію, а також потужні антиоксидантні властивості [10, 13, 17]. Показано, що біологічно активні сполуки якона, а саме сесквітерпенові лактони (енгідрин, уведалін, сонхіфолін) мають цитотоксичну дію щодо клітин лінії HeLa. Посилення апоптичної загибелі цих клітин було підтверджено морфологічним аналізом, визначенням ступеня вивільнення лактатдегідрогенази та пригніченням синтезу ДНК. Також описано пригнічуючий вплив цих біологічно активних речовин на синтез транскрип-

ційного фактора NF- κ B, який регулює експресію проапоптичних генів (Bcl-2, Bcl-XL та інші) [16]. Проте маловивченим є вплив екстрактів якона на запрограмовану загибель нормальних клітин у нормі та за різних патологій.

Тому метою роботи було з'ясувати вплив водних екстрактів листя й кореневих бульб і суспензій кореневих бульб якона на вміст фрагментованої ДНК та вміст білків p53 і Bcl-2 у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД).

Матеріали та методи

Досліди проведено на білих безпородних щурах–самцях масою тіла 130–180 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах. ЕЦД 1-го типу індукували внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США) з розрахунку 5,5 мг на 100 г маси тіла. Через два тижні після індукції ЦД тваринам *per os* вводили водні екстракти або суспензії у дозі 500 мг/кг маси тіла тварини. Одержання водних екстрактів листя і кореневих бульб якона та суспензій кореневих бульб проводили згідно з [2]. З метою підвищення стабільності й біодоступності біологічно активних речовин до суспензії додавали поверхнево-активні речовини біогенного походження – біокомплекс PS у концентрації 0,1 мл на 1 мл розчину. Поверхнево-активний біокомплекс PS виділяли зі супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas sp.*

В експериментальних дослідженнях використовували такі групи тварин: 1) контрольні тварини (К); 2) контрольні тварини, яким вводили екстракт листя (К+Ел); 3) контрольні тварини, яким вводили екстракт кореневих бульб (К+Ек); 4) контрольні тварини, яким вводили суспензію кореневих бульб і її стабілізовану форму (К+Ск та К+Ск^{Ps}); 5) тварини з ЕЦД (ЕЦД); 6) тварини з ЕЦД, яким вводили екстракт листя (ЕЦД+Ел); 7) тварини з ЕЦД, яким вводили екстракт кореневих бульб (ЕЦД+Ек); 8) тварини з ЕЦД, яким вводили суспензію кореневих бульб і її стабілізовану форму (ЕЦД+Ск та ЕЦД+Ск^{Ps}).

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини фікол-тріомбразу [4].

Біохімічну детекцію апоптозу лейкоцитів проводили за визначенням вмісту фрагментованої ДНК [7]. Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних білків Bcl-2 і p53 використовували непрямий імунопероксидазний метод [1]. За інтенсивністю забарвлення досліджувані клітини були поділені на 3 групи: з негативною (p53– та Bcl-2–), позитивною (p53+ та Bcl-2+) та різко позитивною (p53++ та Bcl-2++) реакцією.

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента з пакету аналізу даних комп'ютерної програми *Microsoft Excel XP*. Дані представлено у вигляді $M \pm m (n)$. Відмінність вважали вірогідними при загальноприйнятій у медико-біологічних дослідженнях ймовірність похибки $P < 0,05$.

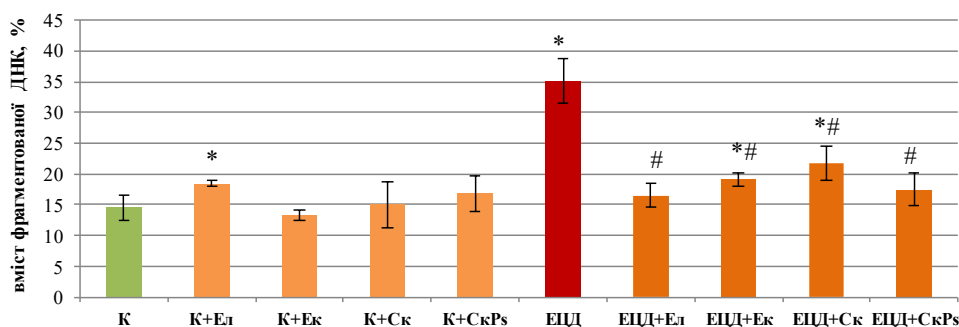
Результати і їхнє обговорення

Однією з характерних біохімічних ознак апоптозу є розщеплення ендонуклеазами ядерної ДНК на низькомолекулярні фрагменти. Спочатку відбувається утворення великих фрагментів ДНК, що супроводжується конденсацією хроматину і випинанням ядерної мембрани. Саме цей початковий етап фрагментації хроматину є ключовою подією клітинної загибелі, після здійснення якого процес стає незворотним [8, 11].

За умов ЕЦД встановлено підвищення вмісту фрагментованої ДНК у лейкоцитах щурів у 2,41 разу (рис. 1). Унаслідок порушення структури ДНК у клітині підвищується рівень протеїну p53, на що вказує зростання кількості клітин із позитивною та різко по-

зитивною реакцією (відповідно на 18 % та на 268 %) та зниженням кількості клітин із негативною реакцією (на 21 %) на вміст білка p53 (табл. 1). Завдяки своїй транскрипційній функції цей протеїн здатний активувати гени, що беруть участь в індукції загибелі клітини шляхом апоптозу. Також p53 здатний безпосередньо індукувати загибель клітини шляхом запуску каспазного каскаду по мітохондріальному шляху [5, 8]. У розвитку апоптозу принципове значення має дослідження дії факторів, які здатні запобігати включенню програми загибелі клітини. Значний інтерес у цьому плані становить продукт онкогену Bcl-2. Bcl-2 сприяє утворенню у мітохондріях іонних каналів, стабілізуючи таким чином мітохондріальну цитохром-с-оксидазу і зв'язує білки, які задіяні в апоптозі [3]. Розвиток ЕЦД супроводжувався зростанням кількості клітин із позитивною та різко позитивною реакцією на вміст білка Bcl-2 (відповідно на 23 % та на 143 %) на фоні зростання цих клітин встановлено зменшення кількості клітин із негативною реакцією на 16 % (табл. 2).

Отримані результати вказують на синергізм дії білків p53 і Bcl-2 у регуляції запрограмованої клітинної смерті та свідчать про посилення процесу апоптозу лейкоцитів за умов ЕЦД. Порушення процесів клітинної загибелі може бути наслідком хронічної гіперглікемії, яка при ЦД призводить до утворення активних форм кисню, активації iNOS (індуцибельної синтази оксиду Нітрогену), продукування NO з подальшим утворенням пероксинітриду й високореактивних гідроксильних радикалів. Така надмірна кількість активних форм Оксигену та Нітрогену спричиняє інтенсивне пошкодження ДНК з подальшим порушенням співвідношення білків регуляторів апоптозу в клітинах-мішенях [9, 12].



Вміст фрагментованої ДНК у лейкоцитах щурів за умов введення водних екстрактів і суспензій якона здоровим тваринам і тваринам з ЕЦД. Тут і в таблицях: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Введення водного екстракту листа якона тваринам з ЕЦД призводило до гальмування фрагментації ДНК та нормалізації вмісту білків регуляторів апоптозу, на що вказує зниження кількості p53⁺ та Bcl-2⁺ клітин (відповідно на 12 % та 9 %) та p53⁺⁺ клітин на 69 % та збільшення кількості p53⁻, Bcl-2⁻ та Bcl-2⁺⁺ клітин (відповідно на 23 %, 5 % та 40 %) (див. рисунок, табл. 1 і 2).

Водний екстракт кореневих бульб якона у тварин з ЕЦД зумовлював зниження фрагментації ДНК на 45,78 % (див. рисунок). Зниження фрагментації ДНК за дії екстракту кореневих бульб не супроводжувалося достовірними змінами кількості клітин, що відрізняються за вмістом білків p53 та Bcl-2 (табл. 1 і 2). Натомість нестабілізована та стабілізована форми суспензії кореневих бульб якона за умов ЕЦД сприяли зменшенню інтенсивності фрагментації ДНК відповідно на 38 % та на 50 % і зумовлювали нормалізацію вмісту білків p53 та Bcl-2 лейкоцитів щурів (табл. 1 і 2).

Таблиця 1

Співвідношення (%) лейкоцитів периферичної крові, які відрізняються за вмістом білка p53, у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення водних екстрактів і суспензій якона ($M \pm m$, $n=4-8$)

Умови експерименту	p53-	p53+	p53++
К	56,03±2,98	42,5±3,09	1,47±0,12
К+Ел	54,03±2,98	44,1±2,09	1,87±0,12
К+Ек	55,88±5,92	42,51±1,46	1,61±0,25
К+Ск	55,9±2,93	41,96±2,47	1,47±0,12
К+СкPs	57,08±1,86	41,31±1,98	1,61±0,62
ЕЦД	44,35±2,39*	50,22±2,83*	5,42±0,36*
ЕЦД+Ел	54,58±4,86#	43,76±1,95#	1,66±0,49#
ЕЦД+Ек	43,32±1,16*	50,04±2,89*	6,64±0,34*#
ЕЦД+Ск	50,96±1,47#	47,36±2,24	1,68±0,28#
ЕЦД+СкPs	58,67±3,11#	40,02±2,39#	1,31±0,12#

У здорових тварин введення досліджуваних екстрактів і суспензій не призводило до достовірних змін вмісту фрагментованої ДНК та співвідношення клітин, що відрізняються за вмістом білків p53 і Bcl-2 (див. рисунок, табл. 1 і 2), виняток становить екстракт листя, застосування якого призводило до незначного зростання вмісту фрагментованої ДНК (див. рисунок).

Таблиця 2

Співвідношення (%) лейкоцитів периферичної крові, які відрізняються за вмістом білка Bcl-2, у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення водних екстрактів та суспензій якона ($M \pm m$, $n=4-8$)

Умови експерименту	Bcl-2-	Bcl-2+	Bcl-2++
К	62,66±2,39	35,9±2,19	1,45±0,13
К+Ел	58,66±1,99	39,67±2,71	1,67±0,18
К+Ек	58,81±1,81	40,46±2,73	0,73±0,04
К+Ск	58,06±2,23	40,19±2,3	1,75±0,24
К+СкPs	60,36±3,14	38,09±2,4	1,55±0,22
ЕЦД	52,38±2,59*	44,11±2,34*	3,52±0,36*
ЕЦД+Ел	55,12±2,99*	39,95±1,83#	4,93±0,54*#
ЕЦД+Ек	59,51±1,94#	38,28±2,33 #	2,21±0,27*#
ЕЦД+Ск	57,31±3,61#	40,9±2,21	1,79±0,29*#
ЕЦД+СкPs	60,73±4,89	37,61±2,55	1,66±0,29#

Найбільш виражений пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель клітин за умов ЕЦД притаманний водному екстракту листя і стабілізованій суспензії кореневих бульб якона. Встановлений позитивний коригуючий вплив можна пов'язати з наявністю у їхньому складі поліфенолів, представлених протокатеховою, хлорогеновою, кавовою, феруловою (сліди), розмариною кислотами та їхніми похідними і незамінною амінокислотою – триптофаном, що відомі своїми потужними антиоксидантними властивостями [9, 15, 18]. Ці сполуки, шляхом прямої інактивації та нейтралізації вільних радикалів з подальшим їхнім перетворенням у малоактивні форми, здатні пригнічувати вплив активних метаболітів Оксигену й Нітрогену на ступінь пошкодження ДНК, що в кінцевому результаті може призводити до нормалізації вмісту білків регуляторів апоптозу [6].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Беркало Л. В., Бобович О. В., Боброва Н. О. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині // Полімет. 2003. 320 с.
2. Горбулінська О., Хохла М., Гачкова Г., Сибірна Н. Вплив якона (*Smallanthus Sonchifolius* Roerr. & Endl.) на клітини крові щурів за умов експериментального цукрового діабету // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. 2016. Т. 71. С. 31 – 42.
3. Гриневич И., Камышиный А. Влияние экспериментального сахарного диабета на экспрессию белков-регуляторов апоптоза p53 и Bcl2 в лимфоидных фолликулах селезенки // Морфология. 2010. Т. 4. № 4. С. 19–23.
4. Лаповець Л., Луцик Б. Лабораторна імунологія. К.: Арал, 2004. 173 с.
5. Лук'янова Н. Ю. Особливості експресії білків p53, Bcl-2 та рецепторних тирозинкіназ у пухлинах хворих на рак шлунка // Онкологія. 2009. Т. 11. № 1. С. 35–38.
6. Мишуніна Т. М., Калініченко О. В., Пількевич Л. І., Тронько М. Д. Вплив антиоксидантів на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тканині щитоподібної залози хворих із різною тиреоїдною патологією // Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79. № 5. С. 186–195.
7. Орлова Е. А., Комаревцев В. Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // Актуальные проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии и медицинской генетики. 2001. Т. 6. С. 206–209.
8. Погорелов В. М. Морфология апоптоза при нормальном и патологическом гемопоэзе // Гематология и трансфузиология. 1995. Т. 40. № 5. С. 17–25.
9. Шаповал Г. С., Громовая В. Ф. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода // Укр. биохим. журн. 2003. Т. 75. № 2. С. 5–14.
10. Ayber M. J., Sanchez Riera, et al. Hypoglycemic effect of water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats // J. Ethnopharmacol. 2001. Vol. 74. P. 125–132.
11. Gordon V. Diabetes Voice // Immunol. Cell. Biol. 2008. Vol. 90. 53 p.
12. Keim A., Chi M., Moley K. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53 // Molecular Reproduction and Development. 2001. Vol. 60. P. 214–224.
13. Miura T., Itoh Y., Ishida T. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of the leaf of *Smallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice // Journal of Traditional Medicines. 2004. Vol. 21. P. 275–277.
14. Pacher P., Beckman J. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. № 1. P. 315–424.
15. Park J.S., Yang J. S., Hwang B. Y. Hypoglycemic effect of Yacon tuber extract and Its constituent, chlorogenic acid, in streptozotocin-induced diabetic rats // Biomolecules & Therapeutics. 2009. Vol. 17 № 3. P. 256–262.
16. Siriwan D, Naruse T, Tamura H. Effect of epoxides and α -methylene- γ -lactone skeleton of sesquiterpenes from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves on caspase-dependent apoptosis and NF- κ B inhibition in human cervical cancer cells // Fitoterapia. 2011. Vol. 82. № 7. P. 1093–101.
17. Valentova K., Cvak L., Muck A., et al. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius* // Eur. J. Nutr. 2003. Vol. 42. P. 61–66.
18. Yan X., Suzuki M., Ohnishi-Kameyama M. Extraction and Identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. Vol. 47. № 11. P. 4711–4713.

WATER EXTRACTS AND SUSPENSIONS OF YACON REGULATES CONTENTS OF FRAGMENTED DNA AND PROTEIN REGULATORS OF APOPTOSIS UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 1

A. Horbulinska¹, M. Khokhla¹, L. Mishchenko², N. Sybirna¹

*¹Ivan Franko National University of Lviv
4, Hryshchivskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: aleksaa82@gmail.com*

*²Taras Shevchenko National University of Kyiv
64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine*

The article described the impact of water extracts of leaves and root tubers and root tubers suspensions of yacon on apoptosis of leukocytes from peripheral blood of healthy animals and animals with experimental diabetes mellitus. It was established that under hyperglycemia conditions induction of apoptotic processes in leukocytes is accompanied by disturbance of the proportion of protein regulators of apoptosis (p53, Bcl-2) and increase of DNA fragmentation level. With the introduction of the leaf water extract and root tubers suspensions of yacon to animals with experimental diabetes mellitus we have found their depressing effect on the genetically programmed cell death, as indicated by the normalization of fragmented DNA levels and ratio of protein regulators of apoptosis. However, water extract of root tubers under studied pathology showed no influence on the content of proteins p53 and Bcl-2. The positive corrective effect of yacons leaves water extract and root tubers suspensions can be attributed to the presence in their composition of polyphenols represented by protocatechuic, chlorogenic, caffeic, ferulic (traces), rosemary acids and their derivatives and essential amino acid - tryptophan, which are known for their powerful antioxidant properties.

Keywords: yacon (*Smallanthus sonchifolia* Poepp. & Endl.), diabetes mellitus, apoptosis, leukocytes.

ВОДНЫЕ ЭКСТРАКТЫ И СУСПЕНЗИИ ЯКОНА РЕГУЛИРУЮТ СОДЕРЖАНИЕ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ДНК И БЕЛКОВ РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА

А. Горбулинская¹, М. Хохла¹, . Мищенко², Н. Сибирная¹

*¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4 Львов 79005, Украина
e-mail: aleksaa82@gmail.com*

*²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина*

В статье охарактеризованы особенности влияния водных экстрактов листьев и корневых клубней, а также суспензий корневых клубней якона на апоптоз лейкоцитов периферической крови здоровых животных и животных с экспериментальным

сахарным диабетом. Установлено, что в условиях гипергликемии индукция апоптических процессов в лейкоцитах сопровождается нарушением количественного соотношения протеинов регуляторов апоптоза (p53, Bcl-2) и увеличением степени фрагментации ДНК. При введении водного экстракта листьев и суспензий корневых клубней якона животным с экспериментальным сахарным диабетом выявлено их угнетающее влияние на генетически запрограммированную гибель клеток, на что указывает нормализация содержания фрагментированной ДНК и соотношение белков регуляторов апоптоза. В то же время водный экстракт корневых клубней в условиях исследуемой патологии не оказывает влияния на содержание белков p53 и Bcl-2. Установлено положительно корректирующее влияние водного экстракта листьев и суспензий корневых клубней якона, которое можно связать с наличием в их составе полифенолов, представленных протокатехиновой, хлорогеновой, кофейной, феруловой (следы), розмариновыми кислотами и их производными, а также незаменимой аминокислотой - триптофаном, которые известны своими мощными антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: якон (*Smallanthus sonchifolia* Poir. & Endl.), сахарный диабет, апоптоз, лейкоциты.