

УДК: 615.322:616.379-008.64:612.111

**ВПЛИВ ЕКСТРАКТІВ І СУСПЕНЗІЙ ЯКОНА
(*SMALLANTHUS SONCHIFOLIA*) НА ЗМІНИ СТРУКТУРИ ВУГЛЕВОДНИХ
ДЕТЕРМІНАНТ ГЛІКОКОН'ЮГАТІВ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЗА УМОВ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

О. Горбулінська^{1*}, М. Нагалєвська¹, Л. Міщенко², Н. Сибірна¹

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

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

У статті наведено результати дослідження впливу водних екстрактів листя й кореневих бульб і суспензій кореневих бульб якона у дозі 500 мг/кг на зміни структури вуглеводних детермінант глікокон'югатів мембран еритроцитів та їхню стійкість до дії кислотного гемолітика за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу. Досліджувана патологія супроводжується порушенням функціонального стану та зміною гліканового профілю плазматичної мембрани еритроцитів. Зокрема, встановлено, що розвиток цукрового діабету супроводжується зниженням стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика, зростанням кількості фізіологічно старих еритроцитів і зменшенням вмісту сіалових кислот у складі олігосахаридних глікокон'югатів мембран еритроцитів, приєднаних як ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-, так і ($\alpha 2 \rightarrow 3$) – глікозидними зв'язками до субтермінальних цукрів, а також зростанням ступеня експонування субтермінальних залишків галактози. За введення досліджуваних екстрактів і суспензій якона тваринам з експериментальним цукровим діабетом відмічено позитивний ефект на фізико-хімічний стан мембран еритроцитів. Застосування екстрактів і суспензій якона демонструє зростання у кров'яному руслі кількості молодих форм еритроцитів і клітин середнього віку на фоні зниження старих еритроцитів. Встановлено, що найбільш виражений вплив притаманний водним суспензіям кореневих бульб якона, застосування яких приводить до нормалізації структури глікокаліксу мембран еритроцитів, до нормалізації вмісту сіалових кислот на поверхні еритроцитів, з одночасним зниженням вмісту субтермінальних залишків галактози. Коригуючий вплив досліджуваних екстрактів і суспензій на фізико-хімічний стан мембран еритроцитів може бути експериментальним підтвердженням потреби розробки функціональних харчових продуктів на основі якона, які можуть бути застосовані в комплексній терапії цукрового діабету й дадуть змогу уникнути шкідливих ефектів гіперглікемії.

Ключові слова: якон (*Smallanthus sonchifolia* Poerr. & Endl.), цукровий діабет, мембрани еритроцитів, глікокон'югати, фітотерапія

Структурно-функціональні порушення системи крові відіграють важливу роль в ініціації та прогресуванні цукрового діабету (ЦД). У формуванні реологічних параметрів крові головну роль відіграють еритроцити, оскільки вони становлять 98 % загального об'єму формених елементів крові [9, 19]. Хронічна гіперглікемія зумовлює порушення форми еритроцита, яка відрізняється від фізіологічної та призводить до скорочення тривалості життя цих клітин у кров'яному руслі більш ніж на 13 %, що спричинено посиленням процесів вільнорадикального окиснення. Інтенсифікація процесів вільнорадикального

окиснення сприяє пошкодженню ліпідних і білкових компонентів мембран еритроцитів, зростанню рівня токсичних ліпопероксидних сполук, які, у свою чергу, посилюють процеси дестабілізації клітинних мембран і субклітинних структур [19, 24, 30].

За фізіологічних умов на одному еритроциті зосереджено більше 50 мільйонів залишків ацетилнейрамінової (сіалової) кислоти. Сіалові кислоти задіяні у процесі розпізнавання великої кількості молекул, серед яких гормони, токсини, лектини й антитіла, а з іншого боку, ці кислоти виконують протилежну функцію – маскують і захищають вуглеводні залишки у структурі антигенних детермінант, рецептори та молекули клітинної поверхні [21, 25]. Сіалові кислоти є похідними нейрамінової кислоти, найбільш поширеними є N-ацетилнейрамінова (NeuAc) та N-гліколілнейрамінова (Neu5Gc) кислоти [22]. Відомо, що фізіологічно здорові тканини організму людини не містять N-гліколілнейрамінову (Neu5Gc) кислоту у вуглеводному ланцюзі глікопротеїнів та гліколіпідів, тому йому притаманні антигенні властивості для людини [17]. N-ацетилнейрамінова (NeuAc) кислота входить до складу гангліозидів і належить до класу глікофінголіпідів, які є основним компонентом еритроцитарної мембрани. Відомо, що N-ацетилнейрамінова кислота (NeuAc) зв'язана глікозидними зв'язками з олігосахаридами, глікопротеїнами та гангліозидами, які переважно зв'язані з галактозою (Gal) через α 2,3- або α 2,6-зв'язки. Функціональна активність вуглеводних детермінант на мембрані клітин узалежнена не лише від кількості й типу похідних нейрамінової кислоти, але й від типу зв'язку, яким вони приєднані до субтермінальних моноцукрів. Старіння еритроцитів супроводжується видаленням сіалової кислоти з термінального положення глікопротеїнів плазматичної мембрани, що посилює процеси опсонізації поверхні мембрани цих клітин. Збільшення кількості імуноглобулінів на мембрані еритроцитів сприяє швидкому їх руйнуванню [20, 22].

До переліку засобів у комплексній терапії ЦД обов'язково мають бути включені біологічно активні речовини рослинного походження з високою антиоксидантною активністю (вітаміни А, Е, С, селен, каротиноїди, антоціанідини, флавоноїди та фенольні сполуки). Дослідженнями останніх років з'ясовано, що завдяки інгібуючому впливу на процеси переокисного окислення ліпідів (ПОЛ) антиоксиданти здатні стабілізувати структуру клітинних мембран, нормалізувати їхню проникність, покращувати мікроциркуляцію, прискорювати утилізацію продуктів ПОЛ [12].

Перспективним джерелом рослинних антиоксидантів є якон (*Smallanthus sonchifolius* Roeser. & Endl.), збагачений різноманітним поліфенолів, серед яких кавова, хлорогенова, ферулова і протокатехова кислоти, а також незамінна амінокислота – триптофан [27, 31]. Попередньо проведеними нами дослідженнями показано, що водні екстракти листя і кореневих бульб якона мають значну антиоксидантну дію [18].

Тому метою нашої роботи було дослідити мембраностабілізуючу дію водних екстрактів листя і кореневих бульб, а також суспензій кореневих бульб якона за кінетичними параметрами гемолізу, індукованого зниженням рН середовища та за змінами у структурі вуглеводних детермінант поверхневих глікокон'югатів еритроцитарних мембран щурів у нормі та за умов ЕЦД 1-го типу.

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 згідно із „Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями „Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які вико-

ристовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1985) та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження” від 26.02.2006 р.

ЕЦД 1-го типу індукували внутрішньоочеревинним введенням стрептозоточину (“Sigma”, США) з розрахунку 5,5 мг на 100 г маси тіла. Для експерименту використовували тварин із рівнем глюкози більше 15 ммоль/л (після 18-годинного голодування). Через два тижні після індукції ЕЦД тваринам *per os* вводили водні екстракти або суспензію порошку бульб якона.

Для досліджень використовували рослинну сировину якона, інтродукованого в Київській області, яку люб’язно передала професор Київського національного університету імені Тараса Шевченка Л.Т. Міщенко.

Водні екстракти з листя та кореневі бульби якона виготовляли за допомогою настоювання окремих частин рослини у воді (співвідношення 1:10) у два послідовних етапи: 15 хв за температури 100 °С і 45 хв за 20 °С. Отримані екстракти фільтрували й упарювали у вакуумі до одержання сухого залишку за допомогою роторного випарювача LABOROTA 4001 (Heidolph, Німеччина) за температури 60–65 °С. Для досліджень використовували водний розчин випарених екстрактів якона, який упродовж 14 днів вводили тваринам *per os* у дозі 500 мг/кг маси тіла на добу.

Суспензію виготовляли згідно із розробленим нами запатентованим методом [8]. Одержану суспензію і стабілізовану її форму протягом 14 днів вводили тваринам *per os* у дозі 500 мг/кг маси тіла. 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 нестабілізовану форму суспензії кореневих бульб якона (К+Ск); 5) контрольні тварини, яким вводили стабілізовану форму суспензії кореневих бульб якона (К+Ск^{Ps}); 6) тварини з ЕЦД (ЕЦД); 7) тварини з ЕЦД, яким вводили екстракт листя (ЕЦД+Ел); 8) тварини з ЕЦД, яким вводили екстракт кореневих бульб (ЕЦД+Ек); 9) тварини з ЕЦД, яким вводили нестабілізовану форму суспензії кореневих бульб якона (К+Ск); 10) тварини з ЕЦД, яким вводили стабілізовану форму суспензії кореневих бульб якона (К+Ск^{Ps}).

Для виділення еритроцитів гепаринізовану кров центрифугували за 3000 об/хв протягом 5 хв. Отримані еритроцити тричі відмивали 0,1 М фосфатним буфером, рН 7,4, приготованим на 0,86 % NaCl [11]. Стійкість еритроцитів до дії кислотного гемолітика визначали за методом Терскова і Гітельсона [5]. Криву часової залежності кількості гемолізованих еритроцитів розділяли на відрізки, на основі чого визначали три групи стійкості клітин: відрізок від 1,5 до 3 хв – еритроцити зі зниженою стійкістю (старі); від 3,5 до 4,5 хв – середньостійкі еритроцити (клітини середнього віку); відрізок після 5 хв спостереження характеризує еритроцити із підвищеною стійкістю (молоді).

Лектинофенотипування еритроцитів проводили лектинензиматичним аналізом – ELLA (від англ. Enzyme-Linked Lectin Assay) з використанням біотинільованих лектинів різної вуглеводозв’язувальної специфічності. Метод ґрунтується на здатності лектинів специфічно зв’язуватися з вуглеводними детермінантами глікокон’югатів плазматичних мембран клітин, іммобілізованих на багатолунковому планшеті. Ступінь зв’язування виявляли в ензиматичній реакції за участю лужної фосфатази, міченої авідином, яка каталізує перетворення р-нітрофенілфосфату на продукт жовтого кольору р-нітрофенол. Інтенсивність забарвлення кольорового продукту має пряму залежність від кількості біотинільованих лектинів, які зв’язалися з глікопротеїнами мембрани досліджуваних клітин.

Для досліджень використовували високоадсорбційні плоскодонні 96-лункові планшетки Nunc MaxiSorp. Дно лунок покривали розчином полі-L-лізину, інкубували 1 год за 37 °С і тричі промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). У лунки вносили 0,05 мл суспензії клітин (суспензії еритроцитів у концентрації 2 млн/мл) та інкубували 1,5 год за 37 °С. Вміст лунок витрушували та фіксували клітини 0,025 % розчином глутаральдегіду протягом 35 хв за кімнатної температури. Планшетку тричі відмивали ЗФР, додаючи у кожну лунку по 0,2 мл блокуючого буферу (2 % розчин БСА у ЗФР з додаванням Tween-20 до кінцевої концентрації 0,1 %) та залишали на 12 год за 4 °С. Після блокування лунки тричі промивали промиваючим буфером (10 мМ Tris-HCl на 150 мМ NaCl (рН 7,3) з додаванням Tween-20 до кінцевої концентрації 0,1 %), вносили 0,05 мл розчинів біотинільованих лектинів (MAA, RCA, PNA, SNA та NPL (ДАКО, США) та інкубували 1 год за 37 °С. Планшетку тричі відмивали промиваючим буфером, після чого вносили у кожну лунку по 0,05 мл розчину лужної, міченої авідином фосфатази. Інкубували 1 год за 37 °С, промивали, вносили 50 мкл розчину субстрату – р-нітрофенілфосфат і через 15 хв вимірювали оптичну густина за 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі EPOCH (США).

Для характеристики гліканового профілю мембран еритроцитів нами використано такі рослинні лектини: SNA – лектин бузини чорної (специфічний до послідовностей NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DGalNAc, не зв'язує при цьому NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal послідовності в олігосахаридах); MAA – лектин акації амурської (афінний до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal, не зв'язує при цьому зазначені дисахаридні фрагменти, приєднані (α 2 \rightarrow 6) глікозидним зв'язком); RCA – лектин насіння рицини (афінний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридних послідовностей DGal(β 1 \rightarrow 3(4))DGlсNAc, які зазвичай трапляються у структурі N-гліканів) та PNA – лектин насіння арахісу (специфічний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридної послідовності DGal(β 1 \rightarrow 3)DGalNAc – так званого антигена Томсена-Фріденрайха, або Т-антигена. Т-антиген і Т-антиген-споріднені структури на поверхні еритроцитів представлені у вигляді О-зв'язаних гліканів); NPL – лектин нарциса несправжнього (специфічний до термінальних залишків манози у складі дисахаридної послідовності α ,D-Man-1,6-D-Man) [2].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента, за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel XP*. Дані представлено у вигляді $M \pm m$ (середнє арифметичне значення – *M*; стандартна похибка середнього арифметичного – *m*). Відмінність вважали вірогідною за загальноприйнятої у медико-біологічних дослідженнях ймовірності помилки $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Нами досліджувалися показники стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика, які широко використовуються в експериментальній медицині з метою характеристики функціонального стану еритроцитарних мембран. Фізико-хімічну характеристику мембран еритроцитів проводили на основі оцінки: тривалості гемолізу, часу гемолізу максимальної кількості еритроцитів (пік гемолізу) та максимальної частки гемолізованих еритроцитів.

Під час визначення стійкості мембран еритроцитів до дії фізичних і хімічних чинників встановлено, що в червоних кров'яних тільцях у тварин зі стрептозотонін-індукованим ЕЦД відбувається швидке зростання основного піка еритрограми, який припадає на $2,83 \pm 0,44$ хв, зміщення його вліво, тоді як у здорових тварин основна маса еритроцитів гемолізує на $3,33 \pm 0,44$ хв (табл. 1). Отримані результати дослідження вказують на зниження стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов досліджуваної патології,

порівняно зі здоровими тваринами. Відповідно до змін в еритрограмі встановлено зростання кількості старих клітин (на 79 %, порівняно з контролем) на фоні зменшення молодих (на 38 %) еритроцитів у кров'яному руслі тварин із ЕЦД (рис. 3). Таке зниження стійкості мембран еритроцитів та зміщення піка еритрограми ліворуч за досліджуваної патології може бути зумовлене мембранодеструктивними процесами, внаслідок активації перекисного окиснення ліпідів і змін пластичних властивостей еритроцитарної мембрани [3, 6, 7].

Показники резистентності еритроцитів до дії кислотного гемолітика у контрольних щурів і тварин із ЕЦД ($M \pm m$, $n=8-10$)

Умови експерименту	Тривалість гемолізу, хв	Час гемолізу мах кількості еритроцитів, хв	Мах частка гемолізованих еритроцитів %
К	8,89±1,55	3,33±0,44	33,51±5,76
ЕЦД	10,88±1,13*	2,83±0,44*	29,74±1,73

Примітка: тут далі * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Під час введення водних екстрактів листя і кореневих бульб якона тваринам з ЕЦД відмічено позитивний коригуючий ефект на фізико-хімічний стан мембран еритроцитів, на що вказує зростання стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика (рис. 1). Показано зростання у кров'яному руслі кількості молодих форм еритроцитів у 3,44 разу під час застосування екстракту листя й у 1,77 разу під час введення екстракту кореневих бульб якона. Варто зазначити суттєве зниження кількості старих форм еритроцитів за умов діабету після використання як екстракту листя, так і екстракту кореневих бульб якона, відповідно, на 83 % та 56 % (рис. 3).

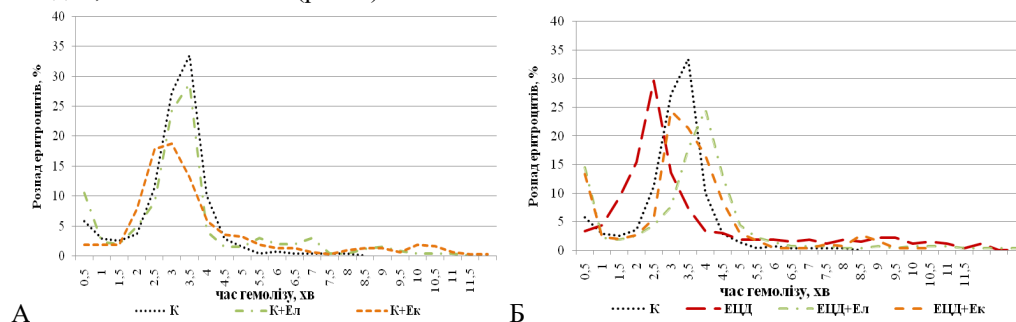
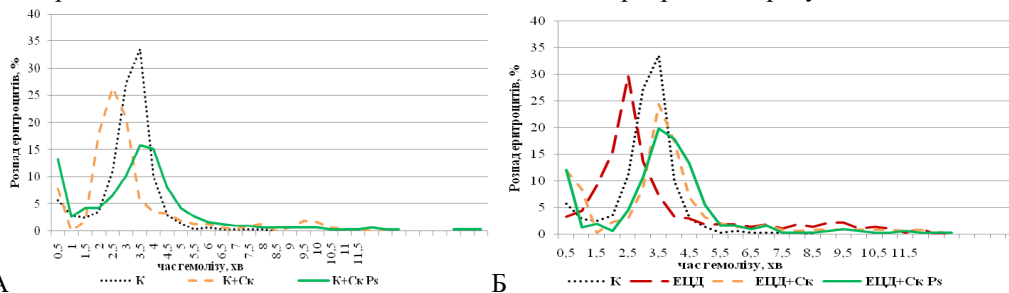


Рис.1. Типові кислотні еритрограми щурів за умов введення водного екстракту листя і кореневих бульб якона здоровим тваринам (А) і тваринам із ЕЦД (Б)

Застосування стабілізованої та нестабілізованої форми суспензій якона тваринам із ЕЦД зумовлювало подібний характер змін стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика з водними екстрактами якона (рис. 2). Проте за використання обох форм суспензій встановлено, що, порівняно з водними екстрактами, відбувається не таке різке зростання кількості молодих еритроцитів і клітин середнього віку, а вміст старих форм еритроцитів практично дорівнює їхньому вмісту в контрольній групі (рис. 3).

Варто відзначити, що застосування нестабілізованої форми суспензії кореневих бульб якона забезпечує різноспрямований її вплив за умов контролю та діабету. Так у тварин із ЕЦД встановлено зростання кількості стійких до кислотного гемолітика форм еритроцитів, натомість у контрольних тварин споживання такої суспензії призводить до зниження стійкості червоних клітин, із відповідною зміною співвідношення вікових популяцій еритроцитів (рис. 2). Можна припустити, що такі різноспрямовані фізіологічні

ефекти нестабілізованої суспензії кореневих бульб якона зумовлені різним його впливом, залежно від функціонального стану організму. Знижуючи концентрацію глюкози за умов ЕЦД, досліджувана суспензія призводить до елімінації деструктивного впливу глюкози на мембрани еритроцитів периферичної крові, тоді як за нормальних фізіологічних умов споживання суспензії зумовлює порушення функціонування певних метаболічних шляхів, що опосередковано виявляє негативний вплив на клітини еритроїдного ряду.



А Б
 Рис. 2. Типові кислотні еритрограми щурів за умов введення суспензій кореневих бульб якона здоровим тваринам (А) і тваринам із ЕЦД (Б)

Аналізуючи отримані результати, ми встановили, що застосування кореневих бульб якона як у вигляді екстрактів, так і у вигляді суспензій зумовлює зниження піка еритрограми з одночасною появою популяцій молодих клітин, лізис яких починається лише з 7,5 хв.

Таке зростання стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика може бути зумовлене високим вмістом біологічно активних речовин у складі якона з антиоксидантними властивостями, а саме поліфенолів (хлорогенової, кавової та ферулової кислот) [23, 32].

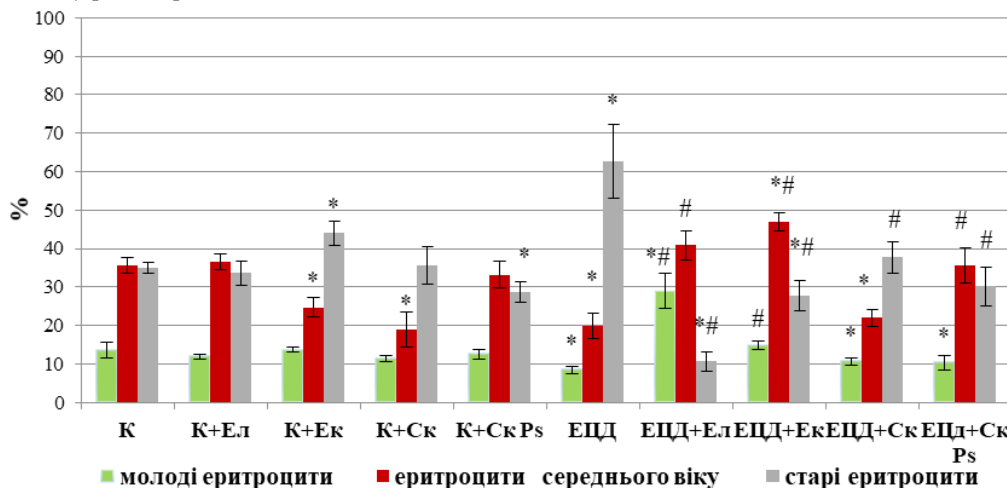


Рис. 3. Розподіл еритроцитів на віковій популяції (залежно від стійкості клітин до дії кислотного гемолітика) у здорових тварин і тварин із ЕЦД

Порушення функціонального стану еритроцитів супроводжується зміною гліканового профілю плазматичної мембрани цих клітин крові. Глікановий профіль мембран еритроцитів за нормального функціонування клітини містить залишки β -D-галактози, певну кількість N-ацетил- β -D-глюкозаміну, α -D-манози, L-фукози та значний

вміст N-ацетилнейрамінової кислоти, тоді як за умов ЦД спостерігається зміна у структурі вуглеводних детермінант і кількості глікопротеїнових рецепторів, які містяться на поверхні мембрани еритроцитів [10].

Нами встановлено, що розвиток ЕЦД супроводжується зменшенням вмісту сіалових кислот у складі олігосахаридних компонентів глікокон'югатів еритроцитів, про що свідчить зниження інтенсивності зв'язування, як SNA, так і MAA, відповідно на 30 % та на 44 %, із поверхневими глікокон'югатами еритроцитів (рис. 4). Зниження інтенсивності зв'язування лектинів бузини чорної та акації амурської може свідчити про зменшення рівня експресії та експонування рецепторів і адгезивних молекул глікопротеїнової природи на поверхні еритроцитів, які містять у своєму складі, як ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-, так і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язані сіалові кислоти. Таке зниження вмісту сіалових кислот за ЦД спричинене не тільки відщепленням залишків цих цукрів, але й зменшенням кількості сіаловмісних гліканових епітопів, що узгоджується з літературними даними [4]. Десіалювання олігосахаридних ланцюгів змінює їхню структуру та сприяє впізнаванню імуноглобуліном G нових антигенів, що призводить до опсонізації еритроцитів і їхньої елімінації макрофагами селезінки та клітинами Купфера в печінці [29].

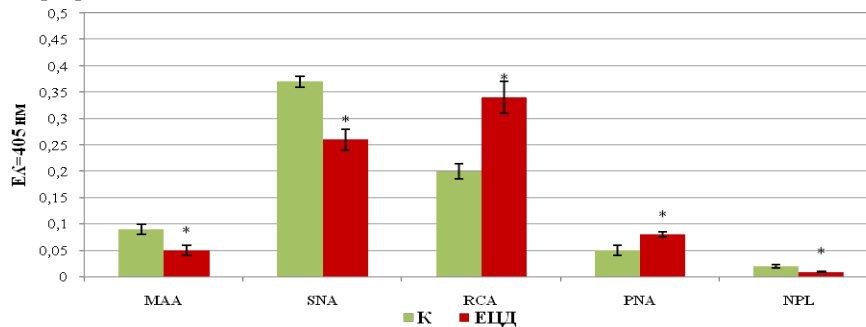


Рис. 4. Лектинензиматичний аналіз структури глікокон'югатів мембран еритроцитів у здорових тварин і тварин із ЕЦД

Для отримання інформації про інтенсивність процесу десіалювання мембранних глікокон'югатів еритроцитів ми також досліджували ступінь експонування цукрів, які у структурі олігосахаридних ланцюгів займають субтермінальну позицію щодо сіалових кислот. У тварин із ЕЦД порівняно з контролем встановлено зростання інтенсивності зв'язування з поверхневими глікокон'югатами галактоспецифічних лектинів: RCA та PNA відповідно на 69 % та 47 % і зниження інтенсивності зв'язування з поверхневими глікокон'югатами лектину NPL, що специфічно взаємодіє із залишками манози (рис. 4). Отже, зміна гліканового профілю мембран еритроцитів характеризується зменшенням кількості залишків манози та сіалових кислот на фоні зростання залишків галактози. Зростання інтенсивності зв'язування галактозоспецифічних лектинів із поверхнею еритроцитів зумовлене десіалюванням, адже відомо, що сіалові кислоти маскують залишки галактози у структурі вуглеводних детермінант [15]. Залишки галактози на поверхні еритроцитів є маркерами для елімінації глікопротеїнів у печінці й інтенсифікації старіння еритроцитів [28].

Введення водного екстракту листя тваринам із ЕЦД сприяє відновленню кількісного та якісного складу вуглеводних детермінант глікокон'югатів мембран еритроцитів, характерного для здорових тварин, про що свідчить зростання кількості експонованих на поверхні клітини залишків N-ацетилнейрамінової кислоти в олігосахаридній послідовності

NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal (зв'язування з лектином MAA), β -D-галактози в олігосахаридній послідовності DGal($\beta 1 \rightarrow 3(4)$)DGlcNAc (зв'язування з лектином RCA), а також α -D-манози (зв'язування з лектином NPL). Водночас відмічено зниження кількості експонованих на поверхні клітини залишків N-ацетилнейрамінової кислоти з олігосахаридною послідовністю NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DGalNAc (зв'язування з лектином SNA) та β -D-галактози з олігосахаридною послідовністю DGal($\beta 1 \rightarrow 3$)DGalNAc (зв'язування з лектином PNA), порівняно з ЕЦД (рис. 5). У контрольних тварин введення досліджуваного екстракту листя зумовлювало зростання кількості експонованих на поверхні клітини залишків β -D-галактози (DGal($\beta 1 \rightarrow 3(4)$)DGlcNAc) та α -D-манози на фоні зниження N-ацетилнейрамінової кислоти, приєднаної $\alpha 2 \rightarrow 6$ глікозидним зв'язком (NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DGalNAc) (рис. 4).

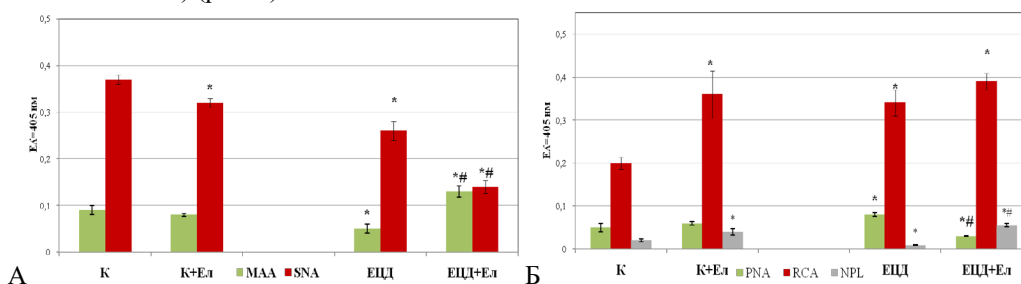


Рис. 5. Лектинензиматичний аналіз структури глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення водного екстракту листя якона здоровим тваринам і тваринам з ЕЦД: А – лектини, що зв'язують сіалові кислоти; Б – лектини, що зв'язують галактозу та манозу

Під час застосування водного екстракту кореневих бульб якона ми встановили протилежний характер змін, зокрема, на поверхні мембран еритроцитів відмічено зниження кількості експонованих залишків сіалових кислот (NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DGalNAc і NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal) і β -D-галактози в олігосахаридній послідовності DGal($\beta 1 \rightarrow 3(4)$)DGlcNAc (зв'язування з лектином PNA), відповідно на 28 % та 38 % і 32 % та зростання кількості експонованих залишків β -D-галактози (DGal($\beta 1 \rightarrow 3$)DGalNAc) та α -D-манози, відповідно на 7 % та 34 %, порівняно з ЕЦД (рис. 6). Аналогічний характер змін відмічено під час введення екстракту кореневих бульб якона здоровим тваринам, виняток становлять лише залишки β -D-галактози (DGal($\beta 1 \rightarrow 3$)DGalNAc) і α -D-манози, кількість яких на поверхні мембран еритроцитів не відрізнялася від контрольних значень (рис. 5).

Встановлений біологічний ефект може бути обумовлений здатністю біологічно активних речовин якона впливати на активність ензимів, які задіяні у перенесенні залишків N-ацетилнейрамінової кислоти (сіалілтрансферази), адже з літературних джерел відомо, що деякі екстракти рослин здатні впливати на активність сіалілтрансфераз [1].

Суспензії кореневих бульб якона у тварин із ЕЦД зумовлювали зростання кількості експонованих на поверхні еритроцитів залишків N-ацетилнейрамінової кислоти і α -D-манози на фоні зниження кількості експонованих залишків β -D-галактози (рис. 7). Більш виражений коригуючий вплив має стабілізована суспензія кореневих бульб якона, що може бути зумовлено зростанням біодоступності біологічно активних речовин у його складі за використання поверхнево-активних біоПАР PS [16].

Отримані експериментальні дані, ймовірно, можна пояснити високим вмістом антиоксидантів у складі якона [14, 23, 26, 32]. Адже відомо, що саме накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів і зниження активності супероксиддисмутази сприяють дестабілізації гліканового профілю мембран еритроцитів [13].

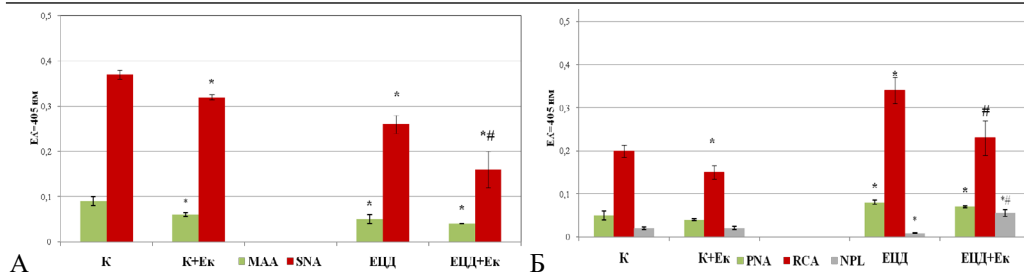


Рис. 6. Лектинензиматичний аналіз структури глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення водного екстракту кореневих бульб якона здоровим тваринам і тваринам із ЕЦД: А – лектини, що зв'язують сіалові кислоти; Б – лектини, що зв'язують галактозу та манозу

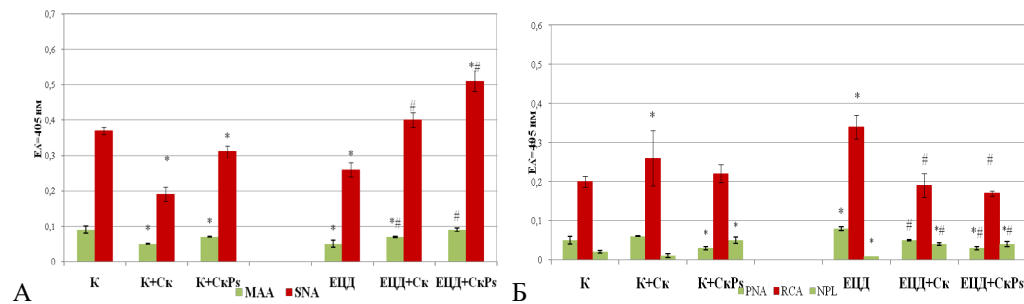


Рис. 7. Лектинензиматичний аналіз структури глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов введення суспензій кореневих бульб якона здоровим тваринам і тваринам із ЕЦД: А – лектини, що зв'язують сіалові кислоти; Б – лектини, що зв'язують галактозу та манозу

Розвиток ЦД супроводжується зниженням стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика, зростанням кількості фізіологічно старих еритроцитів і зменшенням вмісту сіалових кислот у складі олігосахаридних глікокон'югатів мембран еритроцитів, приєднаних як ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-, так і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-глікозидними зв'язками до субтермінальних цукрів, а також зростанням ступеня експонування субтермінальних залишків галактози. Застосування водних екстрактів листя і кореневих бульб якона та суспензій кореневих бульб якона призводить до нормалізації структурно-функціонального стану мембран еритроцитів периферичної крові, на що вказує підвищення стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика та нормалізація вмісту сіалових кислот на поверхні еритроцитів, з одночасним зниженням вмісту субтермінальних залишків галактози. Найбільш виражений протекторний ефект дають суспензії кореневих бульб якона.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аксенов Д. В., Каплун В. В., Тертов В. В. и др. Влияние экстрактов растительного происхождения на активность транс-сиалидазы плазмы крови человека // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. 2007. Т. 143. № 1. С. 52–56.
2. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: Львів. нац. мед ун-т ім. Данила Галицького, 2005. 554 с.
3. Балаболкин М. И. Патогенез инсулинозависимого сахарного диабета // Пробл. эндокринологии. 1985. Т. 31. № 5. С. 48–59.
4. Выдыборец С. В. Изменения эритроцитов при сахарном диабете (обзор) // Врачебное дело. 1990. № 2. С. 56–61.

5. Гительсон М. И., Терсков И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск: Изд-во Сиб. отд. АН СССР, 1959. 246 с.
6. Горбулінська О., Хохла М., Гачкова Г. та ін. Вплив якона (*Smallanthus sonchifolius* Поерр. & Endl.) на клітини крові щурів за умов експериментального цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2016. Вип. 71. С. 31–42.
7. Морозова В. Т. Эритроциты: структура, функции и клинико-диагностическое значение (лекция) // Клини. лаб. диагностика. 2007. № 10. С. 21–35.
8. Пат. 112625 Україна, МПК А61К 45/08 (2006.01), А61К 9/10 (2006.01), А61К 125/00 (2006.01), А61Р 3/10 (2006.01). Спосіб отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона (*Smallanthus sonchifolius* Поерр. & Endl.) // Н. Сибірна, О. Горбулінська, М. Хохла, Р. Вільданова, О. Шульга, О. Карпенко, Н. Щеглова; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – а 2015 13092; заявл. 30.12.2015; опубл. 26.09.2016. Бюл. № 18. 8 с.
9. Салтыков Б., Пауков В. Диабетическая микроангиопатия. М.: Медицина, 2002. 238 с.
10. Себякин Ю. Л., Евстигнеева Р. М. Гликоконьюгаты, углеводные цепи гликопротеинов: структура // Успехи биол. химии. 1988. № 28. С. 213–225.
11. Сибірна Н. О., Бурда В. А., Чайка Я. П. Методи дослідження системи крові: навч.-метод. посіб. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка. 2005. 100 с.
12. Убашеев И. О. Морфофункциональные основы регенерационной терапии природными лекарственными средствами экспериментальных повреждений печени // Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2005. 224 с.
13. Berti G., Ventrelli I., Cangupta Y. Changes in phospholipids of red cell membrane in some diserythropoetic anemias // Indian. J. Pathol. Bacteriol. 1999. Vol. 16. N 3. P. 12–22.
14. Dunych A. A., Dashchenko A. V., Sereda A. V. Phenolic compounds yakon (*Polymnia sonchifolia* Поерр. & Endl.) Ukrainian introductions // VIII International Symposium on phenolic compounds: fundamental and applied aspects. 2012. P. 66–71. (In Russian).
15. Huang Y. X., Wu Z. J., Mehrishi J. et al. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties // J. Cell. Mol. Med. 2011. Vol. 15. N 12. P. 2634–2642.
16. Imura T., Yanagishita H. Thermodynamically stable vesicle formation from glycolipid biosurfactant sponge phase // Biointerfaces Rev. 2005. Vol. 43. N 2. P. 115–121.
17. Irie A., Koyama S., Kozutsumi Y. et al. The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. N 5. P. 15866–15871.
18. Khokhla M., Horbulinska O., Hachkova H. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Поерр. & Endl.) H. Robinson) Improved Erythrocyte Resistance to Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rats // Advances in Diabetes and Metabolism. 2015. Vol. 3. N 3. P. 17–25.
19. Lindmark K., Engstrom K. G. Theoretical and experimental aspects of erythrocyte filterability testing; flow acceleration and systemic resistance // J. Biomech. 2002. N 5. P. 683–688.
20. Marchesi V. T., Tillack T. W., Jackson R. L. Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. Vol. 69. N 6. P. 1445–1449.
21. Murai M., Aramaki Y., Tsuchiya S. Alpha 2-macroglobulin stimulation of protein tyrosine phosphorylation in macrophages via the mannose receptor for Fc gamma receptor-mediated phagocytosis activation // Immunology. 1996. Vol. 89. N 3. P. 436–441.
22. Nigam P. K., Narain V.S., Kumar A. Sialic acid in cardiovascular diseases // Indian. J. Clin. Biochem. 2006. Vol. 21. N 1. P. 54–61.

23. *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. N 3. P. 256 – 262.
24. *Riquelme B., Foresto P., D'Arrigo M.* et al. A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. Vol. 62. N 2. P. 131–141.
25. *Toegel S., Pabst M., Wu S. Q., Grass J.* Phenotype-related differential alpha-2,6- or alpha-2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes // *Osteoarthritis Cartilage*. 2010. Vol. 18. N 2. P. 240–248.
26. *Valentova K., Cvak L., Muck A., Ulrichova J.* Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius* // *Eur. J. Nutr.* 2003. Vol. 42. N 1. P. 61–66.
27. *Valentová K., Lebeda A., Dolezalová I.* et al. The biological and chemical variability of yacon // *J. Agr. Food Chem.* 2006. Vol. 54. N 4. P. 1347–1352.
28. *Venerando B., Fiorilli A., Croci G.* et al. Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients // *Blood*. 2002. Vol. 99. N 3. P. 1064–70.
29. *Vitak T., Taras Y., Wasser S.* et al. Structural Changes of erythrocyte surface glycoconjugates after treatment with medicinal mushrooms // *Int. J. Med. Mushrooms*. 2015. Vol. 17. N 9. P. 867–878.
30. *Watala C., Gwozdziński K., Malek M.* Direct evidence for the alterations in protein structure and conformation upon in vitro nonenzymatic glycosylation [Text] // *Int. J. Biochem.* 1992. Vol. 24. P. 1295–1302.
31. *Xiang Z., He F., Kang T.* Anti-diabetes constituents in leaves of *Smallanthus sonchifolius* // *Natural Product Communication*. 2010. Vol. 5. N 1. P. 95–98.
32. *Yan X., Suzuki M., Ohnishi-Kameyama M.* Extraction and Identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) // *J. Agric. Food Chem.* 1999. Vol. 47. N 11. P. 4711–4713.

Стаття: надійшла до редакції 14.05.18

доопрацьована 17.10.18

прийнята до друку 18.10.18

**INFLUENCE OF YACONS (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIA*) EXTRACTS
AND SUSPENSIONS ON CHANGES IN THE STRUCTURE OF ERYTHROCYTES
MEMBRANES GLYCOCONJUGATES CARBOHYDRATE DETERMINANTS
UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS**

A. Horbulinska¹, M. Nagalievskaya¹, L. Mishchenko², N. Sybirna¹

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

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

The article presents the results of the study dedicated to the influence of yacons leaves and root tubers water extracts and suspensions of roots in a dose of 500 mg/kg on changes in the structure of erythrocytes membranes glycoconjugates carbohydrate determinants and erythrocytes resistance to acidic hemolytic activity under conditions of

experimental diabetes mellitus (EDM) type 1. Investigated pathology is accompanied by a violation of the functional state and by a change in the glycane profile of the erythrocyte plasma membrane. In particular, it has been established that the development of diabetes mellitus is accompanied by a decrease in the stability of erythrocytes membranes to the action of acid hemolysis, an increase in the number of physiologically old erythrocytes and a decrease in the content of sialic acids in oligosaccharide glycoconjugates of erythrocyte membranes attached by ($\alpha 2 \rightarrow 6$)- and ($\alpha 2 \rightarrow 3$)- glycoside bonds to subterminal sugars, as well as the growth of the expression of subterminal galactose residues. At administration of the studied extracts and suspensions to animals with an EDM the positive effect on the physicochemical state of the erythrocyte membranes was noted. The use of yacons extracts and suspensions cause in bloodstream the growth of number of erythrocytes young forms and middle-aged cells, on the background lowering of red blood cells old forms. It was established that the most pronounced effect is inherent in water suspensions of yacons roots tubers, the application of which leads to the normalization of the structure of the membranes glycocalyx of red blood cells, to normalization of sialic acids content on the surface of erythrocytes, with the simultaneous decrease in the content of subterminal galactose residues. Corrective effect of investigated extracts and suspensions on the physicochemical state of erythrocyte membranes can be an experimental confirmation of the need for the development of functional foods based on yacon, which can be used in complex therapy of diabetes and prevent the harmful effects of hyperglycemia.

Keywords: yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.), diabetes mellitus, erythrocytes membranes, glycoconjugates, phytotherapy