



УДК 579.222:615.322:615.451.2

ЗАСТОСУВАННЯ БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ДЛЯ СТАБІЛІЗАЦІЇ ФІТОПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БЕЗАЛКАЛОЇДНОЇ ФРАКЦІЇ ЕКСТРАКТУ КОЗЛЯТНИКА ЛІКАРСЬКОГО (*GALEGA OFFICINALIS* L.)

**М. І. Лупак¹, М. Р. Хохла¹, Г. Я. Гачкова¹, О. М. Шульга²,
Н. С. Щеглова², Р. І. Вільданова², А. Р. Зинь³, Н. О. Сибірня¹**

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту
фізико-органічної хімії і вулехімії імені Л. М. Литвиненка
вул. Наукова, 3а, Львів 70060, Україна

³Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
при ГУМВС України у Львівській області
вул. Збиральна, 24, Львів 79040, Україна
e-mail: sybima_natalia@yahoo.com

У статті представлено результати досліджень впливу біогенних поверхнево-активних речовин (біоПАР), що синтезуються бактеріями *Pseudomonas* sp. PS-17, на стійкість емульсії на основі вихідної суміші, що містила безалкалоїдну фракцію екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.). Обрано оптимальне співвідношення компонентів для утворення стійкої дрібнодисперсної емульсії. Було досліджено хімічний склад безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського до та після стабілізації. Отриману субстанцію легше вводити тваринам через зонд, що не лише покращує точність дозування препарату, а й підвищує його біодоступність. Зниження вмісту глікозильованого гемоглобіну на 13,4 % та вмісту глюкози до фізіологічних значень у крові щурів із експериментальним цукровим діабетом за введення протягом 14 діб стабілізованої емульсії порівняно із вихідною емульсією свідчить, що стабілізована за допомогою біоПАР емульсія на основі безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського ефективніше забезпечує компенсацію гіперглікемії порівняно з вихідною сумішшю, що може бути зумовлене змінами кількісного співвідношення біологічно активних речовин екстракту в разі його стабілізації та кращою біодоступністю.

Ключові слова: біогенні поверхнево-активні речовини, *Pseudomonas* sp. PS-17, емульсія, безалкалоїдний екстракт козлятника лікарського, *Galega officinalis* L., експериментальний цукровий діабет.

ВСТУП

Створення рецептурних сумішей фармацевтичних лікарських препаратів залежить від багатьох факторів, одним із яких є розчинність вибраних для композиції

складників. Будь-яка сировинна суміш із лікарських рослин має бути гідрофільною, зберігати свою біологічну активність, мати прийнятний зовнішній вигляд і містити офіційно визнані безпечні наповнювачі [6, 23]. Стабільність також є суттєвою характеристикою отриманого фітопрепарату. Важливо забезпечити великий термін зберігання і краще за кімнатної температури. Нестабільність і погана розчинність деяких сумішей створює труднощі у приготуванні препаратів, які мають виконувати роль харчового продукту з певною функцією (цукрознижувальною, антиоксидантною тощо). Одним із способів вирішення цієї проблеми є введення у рецептуру поверхнево-активної речовини (ПАР), яка підсилює розчинність цієї лікарської сировини. У сучасних лікарських засобах широко використовуються синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР), які, на жаль, можуть викликати алергічні реакції та підвищувати токсичність препаратів. На даний час у світі є тенденція до відмови від використання високотоксичних ПАР [10, 22]. Натомість постійно зростає комерційний інтерес до ефективних продуктів природного походження, до яких належать біогенні поверхнево-активні речовини – біоПАР [1, 16, 19]. У зв'язку з екологічною безпечністю і високою ефективністю, здатністю до емульгування, солюбілізації та міцелоутворення біоПАР мають великий потенціал до застосування у фармації [23].

Дедалі більшого поширення набуває використання рослинного матеріалу для створення нових лікарських форм. Особливої уваги заслуговують рослини, які здавна використовувались у народній медицині для лікування різних захворювань. Козлятник лікарський (*Galega officinalis* L.) широко застосовується у вигляді настоїв та відварів для лікування цукрового діабету [27]. Однак не завжди отриманий рослинний екстракт або порошок є зручним у використанні, а створення на їхній основі лікарських препаратів потребує певних технологічних підходів. Водні розчини вихідних екстрактів, що містять набір рослинних біологічно активних речовин, часто утворюють суспензії або емульсії, які є нестабільними у часі, тому дотримуватися чіткого дозування такого лікарського засобу практично неможливо.

Емульсії належать до мікрогетерогенних систем, які є досить нестійкими при зберіганні [4, 14]. Стійкість емульсій має велике значення, зокрема, їхнє розшарування порушує точність дозування діючої речовини. Їхня стійкість залежить від багатьох факторів. Для отримання стійких емульсій необхідно додавати стабілізатори [8]. Серед інших стабілізаторів емульсій найбільшої уваги заслуговують ПАР завдяки їхній поліфункціональності. Перевагу віддають таким ПАР, які є малочутливими до рН середовища та безпечними для тварин і людини. Саме ПАР мікробіологічного походження відповідають цим вимогам [19].

Фізіологічна роль більшості мікробних ПАР залишається незрозумілою, але їх пов'язують із ростом мікроорганізмів на водонерозчинних субстратах і впливом на клітинну стінку. Вони сприяють солюбілізації вуглеводнів, утворенню дрібнодисперсної емульсії, в результаті чого полегшується контакт мікробних клітин із гідрофобними субстратами і їх надходження всередину клітини. На даний час біоПАР є об'єктами пильного вивчення. Їхні перевага над синтетичними ПАР полягає в тому, що вони високоефективні, біодеградабельні та мають низьку токсичність.

Мікробні ПАР є ідеальними молекулами для збільшення взаємодії клітини з різними гідрофобними поверхнями. У харчовій промисловості біоПАР використовують як емульгатори під час обробки сировини для формування необхідної консистенції та густини продукту [1].

Бактерії роду *Pseudomonas species* синтезують рамноліпіди [11]. Добре відомо, що рамноліпіди, як й інші ПАР, переводять гідрофобні субстрати у доступну для

клітин форму. Їм притаманні антимікробна й антивірусна дія, здатність до лізису зооспор і участь у формуванні біоплівки. У сучасній літературі доповнено відомості про дію рамноліпідів на клітини про- й евкаріотів, описано роль у русі клітин і механізми утворення біоплівки [29].

Мета роботи – підвищити стійкість емульсій, що готуються на основі безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського – БФ ЕКЛ (далі екстракт – Е) зі застосуванням біоПАР, що синтезуються бактеріями *Pseudomonas* sp. PS-17 – біокомплекс PS – БФ ЕКЛ^{PS} (далі – Е^{PS}) у різних концентраціях. Дослідити компонентний склад отриманих емульсій і порівняти біодоступність біологічно активних речовин БФ ЕКЛ до й після стабілізації за показниками вмісту глюкози та глікозильованого гемоглобіну на моделі експериментального цукрового діабету.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використовували поверхнево-активні продукти біосинтезу культури *Pseudomonas* sp. PS-17 із колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України.

Культивування штаму-продуцента проводили в колбах Ерленмейєра (750 мл), з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 30 °С на рідкому поживному середовищі (г/л): NaNO₃ – 4,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄×7H₂O – 0,5; цитрат Na – 2,0. Джерело Карбону – гліцерин - 30 г/л. Термін культивування – 5 днів.

Поверхнево-активний біокомплекс PS виділяли зі супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 способом кислотного осадження (10% HCl) за pH 3,0. Отриманий осад витримували за 4 °С протягом ночі, відділяли центрифугуванням (8 000 об/хв, 20 хв), сушили у вакуумі до постійної маси.

Згідно з токсикологічним паспортом, середньосмертельна доза (ЛД₅₀) біокомплексу PS за умови внутрішньошлункового введення культуральної рідини для білих щурів і мишей становить більше 10 г/кг, отже, цей біокомплекс належить до речовин 4 класу небезпеки [24]. З огляду на це, застосовані концентрації (0,6–3,3 г/л) біокомплексу PS є нетоксичними для тварин і людини.

Стабілізацію проводили додаванням до вихідної суміші, отриманої у разі додавання води до безалкалоїдної фракції козлятника лікарського біокомплексу PS у концентраціях 0,6; 2,0 і 3,3 г/л з подальшим струшуванням на вортексі.

Структуру емульсій вивчали за допомогою мікроскопа “Kruess” (Німеччина).

Отримання екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) і розділення його на алкалоїдвмісну і безалкалоїдну фракції було проведено згідно з вищеописаним протоколом [9].

Компонентний склад речовин безалкалоїдної фракції визначали за допомогою хроматографа Agilent Technology 6890N з мас-спектрометричним детектором 5979B. Умови аналізу: хроматографічна колонка капілярна HP-5MS завдовжки 30 м і з внутрішнім діаметром 250 мкм, фазою 0,25 мкм. Як газоносій використовували Гелій за постійної швидкості потоку 1,5 мл/хв і об'єму проби 1 мкл. Інжектор – автоінжектор 7683B, Split 20:1, температура випарювача 250 °С. Температуру термостата програмували від 75 °С (протягом 2 хв) з нагріванням 15 °С/хв до 300 °С (протягом 9 хв). Детектор мас-селективний, температура інтерфейса 280 °С, іонізація – електронним ударом, енергія іонізації 70 еВ, температура іонного джерела 230 °С, температура квадруполя 150 °С. Загальна тривалість газової хроматографії 24 хв. Процентний вміст кожного компонента розраховували методом порівняння його

середньої площі піку до загальної площі. Ідентифікацію здійснювали на основі порівняння мас-спектрів із даними мас-спектральних бібліотек NIST05a та WILEY із загальною кількістю спектрів понад 470 000.

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою тіла 110–150 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах згідно з „Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями „Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1985).

Тварин було поділено на групи: перша – контроль (К); друга – здорові тварини, яким вводили БФ ЕКЛ (К+Е); третя – здорові тварини, яким вводили стабілізовану біокомплексом PS форму БФ ЕКЛ (К+Е^{PS}); четверта – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД); п’ята – тварини з ЕЦД, яким вводили БФ ЕКЛ (ЕЦД+Е); шоста – тварини з ЕЦД, яким вводили стабілізовану біокомплексом PS форму БФ ЕКЛ (ЕЦД+Е^{PS}).

ЕЦД 1-го типу індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США) з розрахунку 5,5 мг (у 10 мМ цитратному буфері, рН 5,5) на 100 г маси тіла тварини. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози у крові. Для експерименту використовували тварин з концентрацією глюкози 14 ммоль/л і вище (після 18-годинного голодування). Тваринам другої та третьої, а також п’ятої та шостої груп (через два тижні після індукції цукрового діабету) впродовж чотирнадцяти діб *per os* вводили, відповідно, БФ ЕКЛ та її стабілізовану за допомогою біокомплексу PS форму у вигляді водної емульсії в дозі 0,6 г фітопрепарату (за сухим залишком) на кг маси тіла тварини. Об’єм введеної емульсії завжди дорівнював 1 мл на одну тварину.

Концентрацію глюкози у крові визначали глюкозооксидазним методом із використанням набору реактивів “Філісіт-Діагностика” (Україна). Визначення концентрації глікозилизованого гемоглобіну (HbA1c) проводили згідно з методом [20].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Дані представляли у вигляді $M \pm m$. Статистично значущими вважали дані за умови $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

З літературних джерел відомо, що для створення стабільних у часі емульсій необхідно додавати ПАР. Тому для отримання стабільних емульсій безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського нами було підібрано низку концентрацій біокомплексу PS.

У вихідну суміш безалкалоїдної фракції козлятника лікарського, яка є маслянистою субстанцією та налипає на стінки колби (рис. 1, А), додавали біокомплекс PS у концентраціях 0,6, 2,0 і 3,3 г/л і струшували на вортексі. Як видно, збільшення концентрації біоПАР сприяє утворенню стійкої емульсії, а стінки колби поступово очищаються (рис. 1, Б, В, Г). Ефективність емульгування зростала зі збільшенням концентрації біокомплексу PS до 3,3 г/л.

Досліджено стабільність утворених емульсій упродовж тривалого часу. Встановлено, що додавання біокомплексу PS у всіх досліджених концентраціях до робочого водного розчину БФ ЕКЛ дає змогу отримати стійкі в часі емульсії типу “масло у воді”: отримані емульсії не розшарувалися понад 10 діб.



Рис. 1. Водна емульсія БФ ЕКЛ та її стабілізовані біокомплексом PS форми. Концентрація біокомплексу PS (г/л): А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л

Fig. 1. Water emulsion and its stabilized forms of alkaloid-free fractions isolated from *Galega officinalis* extract with PS biocomplex. Concentration of PS biocomplex (g/l): А – 0 (control); Б – 0.6 g/l; В – 2.0 g/l; Г – 3.3 g/l

Як видно з мікрофотографій (рис. 2), розмір частинок емульсії до 1 мкм. Частинки з таким розміром утворюють стійкі тонкі емульсії [8, 14]. У літературі є дані, що стійкість емульсії залежить від багатьох факторів, зокрема від наявності ПАР. Відомо, що стійкість емульсії зростає за умов утворення на твердих частинках так званої сольватної оболонки, яка перешкоджає злипанню часток і випаданню їх в осад. Саме ПАР у незначних кількостях у дисперсійному середовищі забезпечують утворення таких оболонок [5].

Отримували емульсію при внесенні біокомплексу PS до вихідної суміші, одержаної додаванням води до БФ ЕКЛ. Під час додавання біоПАР у концентрації 0,6 г/л отримана емульсія є неоднорідною: 30 % становлять краплі розміром до 1 мкм, 60 % – краплі розміром 5–10 мкм та 10% – краплі розміром більше 20 мкм (рис. 2, Б). Застосування біоПАР у концентрації 2,0 та 3,3 г/л (рис. 2, В, Г) дає змогу отримати дрібнодисперсні емульсії зі середнім розміром крапель менше 1 мкм, кількість яких становить до 80 %. Такі емульсії були стійкими і не розшарувалися більше 30 діб.

Отже, встановлено, що додавання біоПАР у концентрації 3,3 г/л до вихідної суміші БФ ЕКЛ допомагає отримати стійкі дрібнодисперсні емульсії.

На основі газохроматографічного визначення компонентного складу досліджуваних екстрактів можна припустити, що цукрознижувальна дія екстрактів може бути зумовлена наявністю у їх складі фітолу (3,62% у БФ ЕКЛ та 3,675% у БФ ЕКЛ^{PS}) (див. таблицю), який здатний знижувати інсулінорезистентність, підвищувати чутливість м'язів до інсуліну, знижувати глюконеогенез. З'ясовано, що фінол може спричиняти посилення експресії генів GLUT2 і мРНК глюккінази через активацію RXR (retinoid X receptor) [3], функціонування якого зазнає змін за ЦД.

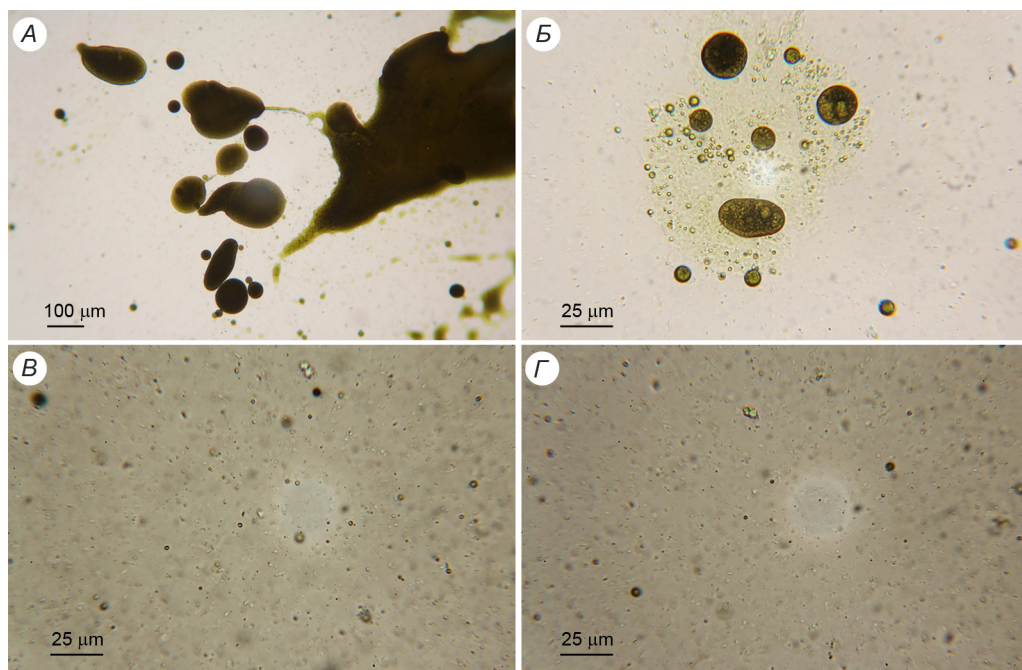


Рис. 2. Мікрофотографії емульсії БФ ЕКЛ та її стабілізованих біокомплексом PS форм. Концентрація біокомплексу PS (г/л): А – 0 (контроль); Б – 0,6 г/л; В – 2,0 г/л; Г – 3,3 г/л

Fig. 2. Microphotographs of alkaloid-free fraction emulsion from *Galega officinalis* extract and its stabilized forms with PS biocomplex. Concentration of PS biocomplex (g/l): А – 0 (control); Б – 0.6 g/l; В – 2.0 g/l; Г – 3.3 g/l

Естери пальмітинової кислоти, вміст яких у БФ ЕКЛ становить 17,59 %, а у БФ ЕКЛ^{PS} 15,47 % (див. таблицю), викликає дозозалежне зниження глюкози в плазмі крові у тварин з експериментальним цукровим діабетом [18].

У складі одержаних нами екстрактів виявлено високий вміст фітостеролів (кампастерол і стигмастерол), зокрема їх вміст у БФ ЕКЛ становить 1,98 і 15,69 %, а у БФ ЕКЛ^{PS} 1,97 і 14,72 %, відповідно (див. таблицю). Наявні у складі екстрактів фітостероли, окрім здатності інгібувати адсорбцію холестеролу, здатні знижувати рівень глікозильованого гемоглобіну [13, 21].

Серед біологічно активних речовин козлятника лікарського з гіпоглікемічною дією можна виділити α -амірин, вміст якого у БФ ЕКЛ становить 2,56 %, а у БФ ЕКЛ^{PS} 1,93 % (див. таблицю). Альфа-амірин здатний впливати на систему канабіноїдів. З'ясовано, що деякі ліганди до канабіноїдних рецепторів СВ1 можуть прямо зв'язуватись і алостерично регулювати Kir6.2/SUR1 K(ATФ)канали, тим самим контролюючи глюкозостимульоване вивільнення інсуліну. Крім цього, α - та β -амірин завдяки своїм протизапальним і антиоксидантним властивостям виявляють позитивний вплив на стан тварин зі стрептозотоциновим цукровим діабетом [17].

Доведено, що похідні хіназоліну здатні знижувати рівень глюкози у крові та знижувати вагу тіла у тварин з ожирінням [28]. Серед таких речовин у досліджуваних екстрактах нами було виявлено 2-метил-1,2,3а,4,5-гексагідропіроло-[1,2-а] хіназолін (у Е 1,90 і у Е^{PS} 2,89 %) (див. таблицю). Такі похідні здатні збільшувати активність

**Якісний склад і кількісний вміст біологічно активних речовин БФ ЕКЛ,
біокомплексу PS і БФ ЕКЛ^{PS}**

Qualitative and quantitative analysis of biologically active substances of alkaloid-free fraction isolated from *Galega officinalis* extract, PS biocomplex and stabilized form of alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract with PS biocomplex

№	Час виходу, хв	Сполука	Вміст, %		
			Е	біокомплекс PS	Е ^{PS}
1.	8,081	2-Деценова кислота, метиловий естер	-	3,794	10,456
2.	8,420	2-Деценова кислота	-	88,230	1,341
3.	9,612	2(4Н)-Бензофуранон	0,358	-	0,628
4.	9,984	2-Додеценова кислота	0,134	4,309	0,359
5.	10,222	Інозитол	2,080	-	3,10
6.	10,638	Міристинова кислота	0,740	-	0,436
7.	10,750	4-Метиламінофенол	0,209	-	0,402
8.	11,215	Неофітадієн	0,830	-	1,010
9.	11,395	Лоліолід	0,749	-	1,339
10.	12,053	Пальмітинова кислота, етиловий естер	15,79	-	10,900
11.	12,232	Пальмітинова кислота, етиловий естер	0,850	-	2,969
12.	12,479	2-метил-1,2,3а,4,5-гексагідропіроло-[1,2-а] хіназолін	1,900	-	2,894
13.	12,999	Фітол	3,620	-	3,675
14.	13,201	9,12,15-Ліноленова кислота, метиловий ефір	17,820	-	33,029
15.	13,332	9,12,15-Октадекатрієн-1-ол, (Z Z,Z)-	1,520	-	0,235
16.	15,235	Пальмітинова кислота, 2-гідрокси-1-(гідроксиметил)етиловий естер	0,950	-	1,611
17.	15,455	Фталева кислота, 2-етилгексил-ізогексилловий естер	8,330	-	2,833
18.	16,085	2Н-1-Бензопіран-7-ол, 3-(2,4-диметоксифеніл)-3,4-дигідро-	1,880	-	1,900
19.	16,287	6а,12а-Дигідро-6Н-(1,3)діоксол(5,6)бензофуоро(3,2-с) хромен-3-ол	1,010	-	1,080
20.	16.816	Сквален	1,670	-	0,343
21.	18,499	Вітамін Е	0,660	-	0,46
22.	19,278	Кампестерол	1,980	-	1,966
23.	19,522	Стигмастерол	4,060	-	4,091
24.	20,015	Стигмастерол	11,630	-	10,634
25.	20,705	9,19-Циклоергост-24(28)-єн-3-ол, 4,14,-диметил-,(3.β.,4.α.,5.α.)-	1,920	-	0,644
26.	20,824	α-Амірин	2,560	-	1,932
27.	22,197	Неофітадієн	1,710	-	0,920

5'АМФ активованої протеїнкінази (АМРК), що призводить до зростання адсорбції глюкози м'язовими клітинами. Крім цього, встановлено, що АМРК, окрім регуляції вивільнення інсуліну клітинами підшлункової залози, інгібує активність ацетил-СоА-карбоксилази і гідроксиметилглутарил-СоА-редуктази в жирових клітинах, перешкоджаючи тим самим біосинтезу жирних кислот і холестеролу. Отже, регуляція активності АМРК є також важливою в боротьбі з ожирінням [12].

Крім цього, заслуговує на увагу високий вміст у досліджуваних емульсіях альфа-ліноленової кислоти (у Е 17,82 і у ЕРS 33,03 %) (див. таблицю). Омега-3 поліненасичені жирні кислоти збільшують плинність клітинних мембран, сприяють підвищенню кількості рецепторів до інсуліну та підвищують спорідненість інсуліну до цих рецепторів, збільшують кількість транспортерів глюкози 4 типу і регулюють баланс між про- і антиоксидантами [15].

На основі аналізу кількісного складу біологічно активних речовин Е та Е^{PS} можна стверджувати, що їх цукрознижувальний ефект зумовлений наявністю у складі фітолу, етилового естеру пальмітинової кислоти, фітостеролів (кампестеролу і стигмастеролу), похідними хіназоліну або їхньою синергічною дією.

З метою оцінки зростання біодоступності біологічно активних речовин у складі БФ ЕКЛ за умов стабілізації досліджуваного екстракту біокомплексом PS нами було проведено визначення концентрації глюкози та глікозильованого гемоглобіну у здорових тварин і тварин з ЕЦД.

Аналіз отриманих результатів довів, що за введення досліджуваних лікарських субстанцій контрольним тваринам вміст глюкози у крові практично не змінювався. Водночас встановлено виражену гіпоглікемічну дію Е та Е^{PS} за умов діабету. У разі 14-денного курсу введення екстрактів тваринам з ЕЦД концентрація глюкози знижувалася (на 39% (Е) та на 37% (Е^{PS}), порівняно з діабетом) до фізіологічних значень (рис. 3).

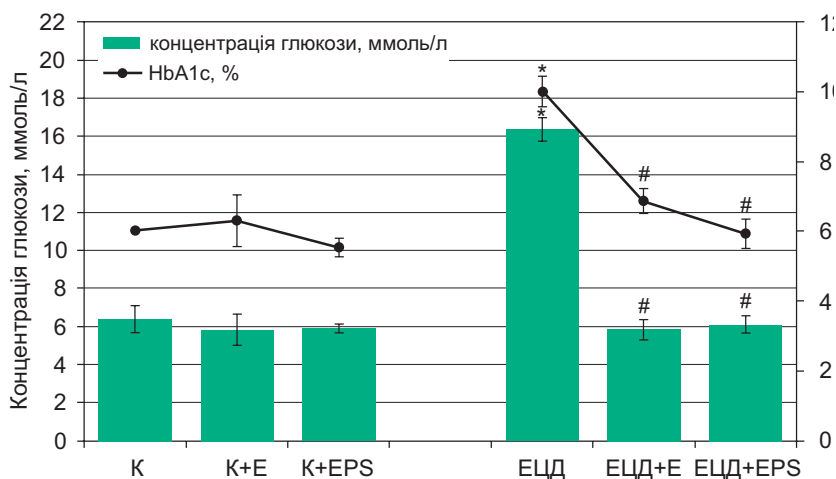


Рис. 3. Вплив БФ ЕКЛ і її стабілізованої форми на вміст глюкози та глікозильованого гемоглобіну за умов ЕЦД ($M \pm m$, $n = 5-10$).

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

Fig. 3. Effect of alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract and it's stabilized form with PS biocomplex on glucose and glycosylated hemoglobin under EDM ($M \pm m$, $n = 5-10$).

* – $P < 0.05$ as compared with control group # – $p < 0.05$ as compared with EDM group

Вимірювання глюкози у крові оцінює поточну (теперішню) концентрацію глюкози, яка може залежати від багатьох чинників (прийому та складу їжі, фізичних навантажень і їх інтенсивності, емоційного стану хворого й навіть часу доби). Очевидна висока ймовірність того, що визначення поточної концентрації глюкози у крові не буде відображати дійсний ступінь компенсації ЦД, а це може призвести або до передозування лікарських препаратів, або до невиправданого зменшення їхньої кількості. Тому на сьогодні вважається, що ключовим показником ступеня компенсації вуглеводного обміну і, відповідно, якості лікування та ризику розвитку віддалених ускладнень цукрового діабету є рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) [7, 2].

Цінність визначення HbA1c в тому, що він характеризує середню концентрацію глюкози у крові протягом тривалого проміжку часу, тобто справжній ступінь компенсації ЦД протягом останніх 1–2 місяців. Рівень HbA1c свідчить одночасно про концентрацію глюкози натще, про допрандіальний і постпрандіальний її рівень.

На тлі гіперглікемії, яка розвивається у щурів за умов ЕЦД, виявлено підвищення глікозилювання гемоглобіну, що на 66% перевищує контрольні значення (рис. 3). Патогенетичне значення високого вмісту HbA1c в еритроцитах полягає в тому, що він утворює міцний зв'язок з киснем і сприяє розвитку тканинної гіпоксії, а це є передумовою виникнення ангіопатій у разі цукрового діабету [2].

Було з'ясовано, що за умов застосування БФ ЕКЛ відбувається зниження вмісту HbA1c у тварин із досліджуваною патологією на 31%, тоді як за використання стабілізованої за допомогою біокомплексу PS емульсії цього екстракту – на 41%, порівняно з діабетом. Отже, застосування стабілізованої форми емульсії БФ ЕКЛ зумовлює більш значне зниження HbA1c (на 13,4%, порівняно з використанням нестабілізованої емульсії), тоді як рівень досліджуваного показника був практично аналогічним такому у контрольних тварин. Кращий рівень скомпенсованості діабету, про що свідчить нижчий рівень HbA1c, зменшує ризик розвитку таких ускладнень діабету, як ретинопатія, нефропатія, ушкодження периферичних нервів і судин [26]. За умов введення досліджуваних екстрактів контрольним тваринам концентрація глюкози та HbA1c не відрізнялася від контрольних значень.

Таким чином, аналіз отриманих результатів вказує на те, що обидва досліджувані екстракти виявляють цукрознижувальну дію лише за умов підвищеної концентрації глюкози, що має місце при цукровому діабеті. Гіпоглікемічний ефект досліджуваних лікарських субстанцій виражений більшою мірою за умови застосування БФ ЕКЛ^{PS}, що може бути обумовлено зростанням розчинності або збільшенням біодоступності біологічно активних речовин у складі екстракту з гіпоглікемічною дією.

ВИСНОВОК

Проведені дослідження довели, що додавання біокомплексу PS до вихідних сумішей, що містять безалкалоїдну фракцію екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.), сприяє утворенню більш стійких емульсій. Такі емульсії легше вводити через зонд піддослідним тваринам, що забезпечує чітке дотримання певного дозування діючих речовин. Цукрознижувальний ефект досліджуваних екстрактів, ймовірно, зумовлений наявністю фітолу, етилового естеру пальмітинової кислоти, фітостеролів, похідними хіназоліну або їхньою синергічною дією. Стабілізована за допомогою біокомплексу PS емульсія, що містить БФ ЕКЛ, ефективніше забезпечує компенсацію гіперглікемії за умов ЕЦД, порівняно з нестабілізованою вихідною сумішшю, що може бути наслідком зростання розчинності та біодоступності біологічно активних речовин у складі екстракту з досліджуваної лікарської рослини.

Робота виконана за сприяння Державного Фонду Фундаментальних Досліджень.

1. *Banat I., Franzetti A., Gandolfi I.* et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010; 87: 427–444.
2. *Bennett C.M., Guo M., Dharmage S.C.* HbA(1c) as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetic Medicine**, 2007; 24(4): 333–343.
3. *Elmazar M., El-Abhar H. S., Schaalan M. F.* et al. Phytol/phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations. **PLoS ONE**, 2013; 8(1): 1–10.
4. *Evstratova K.I., Kunina N.A., Malakhova E.S.* **Physical and Colloid Chemistry**. Moscow: Higher School, 1990. 487 p. (In Russian).
5. *Gelfman M.I., Kovalevich O.V., Yustratov V.P.* **Colloid Chemistry: Textbook for Universities**. Publishing House “Lan”, 2008. 336p.
6. *Hutz N. Kalyniuk T., Belous S.* **Appropriate pharmacy practice: a workshop for students in higher education**. Vinnytsia: Nova Knyga, 2013. 368 p.
7. *Ilyin A.V., Arbuzov M.I., Knyazev A.P.* Glycated Haemoglobin (HbA1c) as a key parameter for monitoring patients with diabetes. Optimal organization of research. **Diabetes Mellitus**, 2008; 2: 60–64.
8. *Khmelevska S., Pavlichko S.* Technology of production according to GMP rules. **Medicine of Ukraine**, 1996; 4: 46–48. (In Ukrainian).
9. *Khokhla M., Kleveta G., Lupak M.* et al. Studies of Galega officinalis extract component. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2013; 62: 55–60. (In Ukrainian).
10. *Khoruzhaya T., Chuchalin V.* **Biopharmacy – scientific direction in the development and improvement of medicines**: Textbook. Tomsk: Laboratory Offset Printing SSMU, 2006. 75 p. (In Russian).
11. *Khopyak N.* Toxicology hygiene and ecological assessments of the complex ecological sorbent glaucocolit modified by surfactant “policom” – bioreagent of ps. species 17 (BIOPAR PS_17). **Environment & Health**, 2011, 3: 48–53. (In Ukrainian).
12. *Leclerc I., Woltersdorf W.W., da Silva Xavier G.* et al. Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. **American J. of Physiol. Endocrinol. and Metabolism**, 2004; 286(6): 1023–1031.
13. *Lee Y.M., Haastert B., Scherbaum W.* et al. A phytosterol-enriched spread improves the lipid profile of subjects with type 2 diabetes mellitus. A randomized controlled trial under free-living conditions. **European Journal of Nutrition**, 2003; 42: 111–117.
14. *Mittal K.L.* **Micellization, Solubilization, and Microemulsions**. Moscow, 1980, 877 p. (In Russian).
15. *Rodriguez-Leyva D., Bassett C.M.C., McCullough R.* et al. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. **Can. J. Cardiol**, 2010; 26(9): 489–496.
16. *Salihu A., Abdulkadir L., Almustapha M.* An investigation for potential development on biosurfactants. **Biotechnology and Molecular Biology**, 2009; 3(5): 111–117.
17. *Santos F. Al., Frota J. T., Arruda B. R.* et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, 2012; 11(98): 1–8.
18. *Sarkodie J., Fleischer T., Edoh D. A.* et al. Antihyperglycaemic activity of ethanolic extract of the stem of *Adenia lobata* Engl (Passifloraceae). **Intern. J. of Pharmac. Sci. and Res**, 2013; 4(4): 1370–1377.
19. *Singh A., Hamme J., Ward O.* Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, 2007; 25: 99–121.
20. *Sybirna N., Burda V. Chajka Ya.* **The research methods of blood system: Instructor’s Manual**. Lviv: Publishing House of Ivan Franko LNU, 2005. 100 p. (In Ukrainian).
21. *Tanaka M., Misawa E., Ito Y.* et al. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as anti-diabetic compounds. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2006; 29(7): 1418–1422.

22. The United Nations Environment Programme. **Report of the Persistent Organic Pollutants Review**. Geneva, 19–23 November 2007. 27 p.
23. *Tikhonov A.I., Yarnykh T.G., Yuryeva A.B.* et al. **Chemist's Technology of Drugs: A textbook for English students of pharmaceutical higher schools and departments**. Kharkiv: PH of NUPh, 2011. 517 p. (In Ukrainian).
24. **Toxicological and hygienic passport of the biopreparat PS (biosurfactant PS)**. Lviv, 2004. 11 p. (Protocol examination #01 from 27.01.2004 of the Department of Hygiene and Preventive Toxicology of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University).
25. *Tikhonov A.I., Yarnykh T.G., Zupanets I.A.* et al. **Biopharmacy: textbook for students of pharmaceutical higher educational establishments and departments**. Kharkiv: NUPh publishing office; Golden pages, 2003. 240 p. (In Russian).
26. *Velkov V.V.* Glycosylated hemoglobin in diagnostics of diabetes mellitus and in assessment of its complications risk. **Laboratory Diagnostics**, 2008; 2 (44): 65–76. (In Ukrainian).
27. *Yakimova T.V., Nasanova O.N., Vengerovsky A.I.* et al. Influence of Galega extracts on lipides metabolism in experimental diabetes mellitus. **Siberian Journal of Medicine**, 2006; 26(4–2): 146–147. (In Russian).
28. Patent application number: 20080207614 QUINAZOLINE DERIVATIVES FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF DIABETES AND OBESITY Inventors: Nam Kyu Lee (Suwon-Si, KR) Jun Won Lee (Gunpo-Si, KR) Sukho Lee (Suwon-Si, KR) Guang-Jin Im (Ansan-Si, KR) Hye Young Han (Seoul, KR) Tae Kon Kim (Suwon-Si, KR) Yong Hyuk Kim (Suwon-Si, KR) Wie-Jong Kwak (Seoul, KR) Wie-Jong Kwak (Seoul, KR) Sang Woong Kim (Daejeon, KR) Joohun Ha (Seoul, KR) Eon Kyum Kim (Daejeon, KR) Jung Kyu Lee (Daejeon, KR) Choong Yeul Yoo (Daejeon, KR) Dae Yeon Lee (Daegu, KR) Assignees: SK Chemicals Co., Ltd. LEADGENEX INC. Industry Academic Cooperation Foundation of Kyunghee University
29. *Pirog T. P., Konon A. D.* Microbial surfactants. I. Glycolipids. **Biotechnological Acta**, 2014; 7(1): 9–30. (In Ukrainian).

APPLICATION OF BIOGENIC SURFACTANTS FOR STABILIZATION OF ALKALOID-FREE FRACTION ISOLATED FROM *GALEGA OFFICINALIS* EXTRACT

**M. Lupak¹, M. Khokhla¹, G. Hachkova¹, O. Shulga²,
N. Sheglova², R. Vildanova², A. Zyn³, N. Sybirna¹**

¹*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Department of Physical Chemistry of Combustible Minerals
L.M. Lytvynenko Institute of Physico-Organic Chemistry and Coal Chemistry, NAS of Ukraine
3a, Naukova St., 79060 Lviv, Ukraine*

³*Research Forensic Centre at the Interior Ministry in Ukraine Lviv Region
24, Zbyralna St., Lviv 79040, Ukraine
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com*

The article contains data on the influence of biogenic surfactants synthesized by bacteria *Pseudomonas* sp. PS-17 on the stability of emulsions based on alkaloid-free fraction isolated from *Galega officinalis* L. extract. The optimum concentrations of biogenic surfactants to stabilize investigated emulsions were experimentally chosen. The chemical composition of alkaloid-free fractions from *Galega officinalis* L. extract before and after stabilization were investigated. The resulting substance is easier to administer to animals through a tube, which not only improves the accuracy of the dosage, but also increases its bioavailability. Reduction of glycosylated hemoglobin at 13.4 % and glucose content to the physiological values in the rats blood with experimental diabetes mellitus by administration within 14 days stabilized emulsions compared with the original emulsion shows that emulsion stabilized by the biogenic surfactant based on alkaloid-free fraction

isolated from *Galega officinalis* an extract provides effective hyperglycemia compensation in rats under experimental diabetes mellitus, compared with the original mixture, which may be caused by changes in the proportion of biologically active substances in the extract while stabilizing and its better bioavailability.

Keywords: biogenic surfactants, *Pseudomonas* sp. PS-17, emulsions, alkaloid-free fraction of *Galega officinalis* L. extract, experimental diabetes mellitus.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ФИТОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БЕЗАЛКАЛОИДНОЙ ФРАКЦИИ ЭКСТРАКТА ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*GALEGA OFFICINALIS* L.)

М. И. Лупак¹, М. Р. Хохла¹, Г. Я. Гачкова¹, О.М.Шульга²,
Н. С.Щеглова², Р. И. Вильданова², А. Р. Зынь³, Н. О. Сибирная¹

¹ Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

² Отделение физико-химии горючих ископаемых
Института физико-органической химии и углехимии им. Л.Н. Литвиненко НАН Украины,
ул. Научная, 3а, Львов 79060, Украина

³ Научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр
при ГУМВД Украины во Львовской области
ул. Збиральна, 24, Львов 79040, Украина
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

В статье представлены результаты исследований влияния биогенных поверхностно-активных веществ (биоПАВ), синтезируемых бактериями *Pseudomonas* sp. PS-17, на устойчивость эмульсии на основе исходной смеси, содержащей безалкалоидную фракцию экстракта галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.). Выбрано оптимальное соотношение компонентов для образования устойчивой мелкодисперсной эмульсии. Был исследован химический состав безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной до и после стабилизации. Полученную субстанцию легче вводить животным через зонд, что не только улучшает точность дозирования препарата, но и повышает его биодоступность. Снижение содержания гликозилированного гемоглобина на 13,4 % и содержания глюкозы до физиологических значений в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом при введении в течение 14 суток стабилизированной эмульсии по сравнению с исходной эмульсией свидетельствует о том, что стабилизированная с помощью биоПАВ эмульсия на основе безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной эффективнее обеспечивает компенсацию гипергликемии по сравнению с исходной смесью, что может быть обусловлено изменениями количественного соотношения биологически активных веществ экстракта при его стабилизации и лучшей биодоступностью.

Ключевые слова: биогенные поверхностно-активные вещества, *Pseudomonas* sp. PS-17, эмульсия, безалкалоидный экстракт галеги лекарственной, *Galega officinalis* L., экспериментальный сахарный диабет.

Одержано: 12.01.2015