

**ВПЛИВ БЕЗАЛКАЛОЇДНОЇ ФРАКЦІЇ ЕКСТРАКТУ
GALEGA OFFICINALIS L. НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ
КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ЛЕЙКОЦИТІВ ЗА УМОВ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

Г. Гачкова¹, Я. Чайка¹, Р. Вільданова², О. Шульга², Н. Сибірна¹

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

² Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії
і вуглехімії імені Л.М. Литвиненка НАН України
вул. Наукова, 3а, Львів 70060, Україна
e-mail: klevetag@gmail.com

У статті наведені дані щодо впливу безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.) (БФЕКЛ) на проліферативну активність клітин білого ростка кісткового мозку щурів за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД). Підвищення рівня проліферації та диференціації клітин попередників лейкоцитів за досліджуваної патології супроводжувалося розвитком оксидативного стресу в цих клітинах, зростанням вмісту фактора некрозу пухлин – α (ФНП- α) у плазмі крові та збільшенням кількості лейкоцитів периферичної крові з ознаками апоптозу. Введення БФЕКЛ коригує порушення процесу кровотворення при цукровому діабеті, індукованому введенням стрептозоточину, що підтверджувалося зміною показників проліферації та диференціації кістково-мозкових попередників лейкоцитів. Встановлено регуляторний вплив цього екстракту на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу, вміст ФНП- α , та процес апоптозу лейкоцитів периферичної крові. Біологічна дія БФЕКЛ може бути опосередкована наявністю у його складі компонентів з підтвердженими гіпоглікемічними, антиоксидантними та протизапальними властивостями.

Ключові слова: безалкалоїдна фракція екстракту козлятника лікарського, цукровий діабет, проліферативна активність, лейкоцити, апоптоз.

Цукровий діабет (ЦД) 1 типу – поліетіологічне захворювання, яке характеризується прогресуючою деструкцією β -клітин підшлункової залози, що призводить до хронічної гіперглікемії. Відомо, що високий рівень глюкози у крові є причиною виникнення запальних процесів, на що в першу чергу реагують клітини крові, а саме лейкоцити. Реакція імунної системи організму на розвиток запального процесу проявляється у стимуляції кровотворення, виході лейкоцитів з резервного пулу кісткового мозку у кров та їхньої міграції з крові у вогнище запалення [21]. Однак процеси кровотворення в кістковому мозку за умов ЦД на сьогоднішній день вивчені недостатньо.

Ключовими ланками у патогенезі ЦД є порушення регуляції імунної відповіді та програмованої загибелі клітин. Контрольований апоптоз є основним механізмом підтримання оптимального балансу клітин у вогнищі запалення, який обмежує експансію активованих клонів і перешкоджає розвитку аутоімунних реакцій [6, 10]. Дослідження проліферативної активності й апоптозу лейкоцитів має важливе клінічне значення, оскільки порушення співвідношення цих процесів сприяє пошкодженню тканини підшлункової залози, а також підвищеній схильності до інфекцій при ЦД. З'ясування механізмів запрограмованої загибелі імунокомпетентних клітин дає змогу певним чином впливати на цей процес з метою регуляції чи корекції та сприяє інтенсифікації пошуку фармакологічних засобів антиапоптичної дії.

В останні десятиліття зріс інтерес діабетологів усього світу до вивчення фармакологічних властивостей лікарських рослин. Накопичено значну кількість фактичного матеріалу про сприятливий вплив лікарських засобів рослинного походження у лікуванні й профілактиці ЦД. Актуальності набуває пошук сполук, які мають гіпоглікемічну дію, регулюють метаболічні процеси та функціональну активність клітин. Перспективною рослиною сировиною, яку можна використовувати для розробки антидіабетичних фітопрепаратів, є *Galega officinalis* L. Ця рослина широко застосовується у народній медицині, але високий вміст алкалоїдів робить її непридатною для використання у терапевтичних кількостях. Методом фракціонування екстракту козлятника лікарського з метою видалення токсичних алкалоїдів [8] було отримано фракцію, збагачену компонентами, що потенційно мають гіпоглікемічну, антиоксидантну та протизапальну дію і не є токсичними [13].

Окреслені питання визначили мету роботи – дослідження особливостей співвідношення процесів проліферації та диференціації клітин білого ростка кісткового мозку й апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів за умов ЕЦД та вивчення коригуючого впливу БФЕКЛ на ці процеси.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях із масою тіла 100–150 г. Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води і перебування в стандартних умовах віварію (12-годинна зміна світла і темряви). Експерименти проводили згідно із «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001). Тварин було поділено на чотири групи по 6 тварин у кожній: перша – контроль; друга – контрольні тварини, яким вводили БФ ЕКЛ (контроль+БФ ЕКЛ); третя – тварини з ЕЦД; четверта – тварини з ЕЦД, яким вводили БФ ЕКЛ (ЕЦД+БФ ЕКЛ). ЕЦД індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину (Sigma, США) у дозі 5,5 мг на 100 г маси тіла. Тваринам 2-ї та 4-ї груп (через два тижні після індукції діабету) *per os* вводили БФ ЕКЛ у вигляді водної емульсії у дозі 0,6 г фітопрепарату (за сухим залишком) на 1 кг їхньої маси тіла впродовж 14 діб. Об'єм введеної емульсії становив 1 мл на одну тварину. Методики одержання та стабілізації БФ ЕКЛ, а також аналіз її компонентного складу опубліковано у наших попередніх працях [8-9].

Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом. Об'єктом досліджень були лейкоцити периферичної крові, клітини білого ростка кісткового мозку та плазма крові щурів. Виділення лейкоцитів із гепаринізованої крові здійснювали методом центрифугування у градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho = 1,076\text{--}1,078 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$) (Ficoll-400, "Pharmacia", Швеція) [4].

Для дослідження проліферативної активності клітин лімфоцитарно-гранулоцитарного ряду кісткового мозку було проведено імуноферментний аналіз, що дає змогу кількісно оцінити рівень включення у проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксіуридину (BrdU). Піддослідним тваринам вводили BrdU фірми "Millipore" (США) з розрахунку 50 мкг/г маси тіла внутрішньочеревно. Через 12 годин після введення BrdU тварин декапітували, виділяли стегнові кістки для подальшої аспірації кісткового мозку. Фракціонування суспензії клітин кісткового мозку здійснювали методом центрифугування у тришаровому градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho_3 = 1,11 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$, $\rho_2 = 1,09 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$ та $\rho_1 = 1,03 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$) [11]. Проліферативну активність визначали згідно з протоколом фірми-виробника набору "BrdU Cell Proliferation Assay" ("Millipore", США).

Для виявлення експонування фосфатидилсерину (ФС) на поверхні лейкоцитів використовували фосфоліпідв'язуючий білок анексин V, кон'югований з флуорохромом – флуоресцеїнізотіоціанатом (Анексин V-FITC, довжина хвилі збудження FITC – 494 нм та

емісії 518 нм). Оскільки при порушенні цілісності мембрани анексин зв'язується із ФС внутрішнього ліпідного моношару, для реєстрації проникності клітинної мембрани використовували додатково суправітальний барвник пропідій йодид (ПЙ) [7]. При проникненні в клітину ПЙ зв'язується з молекулою ДНК та утворює сполуку, що флуоресцює у червоній ділянці видимого діапазону (довжина хвилі збудження 536 нм та емісії 617 нм). Таким чином, метод подвійного флуоресцентного фарбування клітин Анексин V-FITC та ПЙ дає змогу оцінити кількість живих клітин, а також клітин на ранніх та пізніх стадіях апоптозу. У роботі було використано набір реагентів Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, «BioVision» (США). Після відмивання у забуференому фізіологічному розчині, $2 \cdot 10^5$ лейкоцитів ресуспендували у 0,1 мл буферу (10 мМ HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 мМ NaCl і 2.5 мМ CaCl₂) та додавали 5 мкл Annexin V-FITC (робоча концентрація 2,5 мкг/мл) та 5 мкл ПЙ (робоча концентрація 0,5 мкг/мл). Клітини інкубували 15 хв у темряві при кімнатній температурі, після чого до суспензії додавали ще 0,4 мл буферу.

Цитометричний аналіз лейкоцитів проводили на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США). У зразку оцінювали показники прямого світлорозсіювання (FSC) (характеризує розмір клітин), бічного світлорозсіювання клітин (SSC) (характеризує оптичну неоднорідність цитоплазми, характер клітинних включень і гранулярність клітин), а також інтенсивність флуоресценції Annexin V-FITC (FL1) та PI (FL3). Після виключення дебрису (за показниками прямого і бокового світлорозсіювання) і виділення лімфоцитарного гейту визначали кількість Annexin⁺- і PI⁺-клітин у режимі DotPlot (двовимірний гістограма). Результати виражали у відсотках від загальної кількості клітин, застосовуючи таку схему: Annexin V-/PI⁻ – живі клітини, Annexin V⁺PI⁻ – клітини з ранніми ознаками апоптозу; Annexin V⁺PI⁺ – клітини з пізніми ознаками апоптозу; Annexin V-/PI⁺ – клітини з ознаками некрозу. Збір даних і їхню комп'ютерну обробку здійснювали, застосовуючи програмне забезпечення CellQuestPro (Becton Dickinson, США).

При дослідженні морфологічних ознак апоптозу методом світлової мікроскопії цитологічних препаратів для кількісної оцінки інтенсивності апоптозу розраховували апоптотичний індекс, який дорівнює відношенню кількості лейкоцитів з морфологічними ознаками апоптозу до загальної кількості підрахованих клітин [1]. На мазках, профарбованих за Романовським-Гімзою [11], оцінювали кількість мононуклеарних та поліморфноядерних лейкоцитів (МНЛ та ПМЯЛ) з ознаками апоптозу та виражали ці зміни у відсотках. Виявляли токсичну зернистість цитоплазми, вакуолізацію цитоплазми і ядра, пікноз і каріорексис ядра, цейозис мембрани [18].

Вміст ФНП-α у плазмі крові щурів визначали імуноферментним методом згідно з інструкцією фірми-виробника, застосовуючи стандартний набір ELISA (Sigma, США).

Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.11) визначали методом, який ґрунтується на відновленні блідо-жовтого барвника нітросинього тетразолію до темно-фіолетового формагану [16]. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) розраховували за інтенсивністю забарвлення комплексу, який утворюється за взаємодії H₂O₂ з молібдатом амонію [3]. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.9) встановлювали за швидкістю окиснення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутілу [5]. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) досліджували за реакцією утворення забарвленого триметинного комплексу з тіобарбітуровою кислотою [12]. Концентрацію протеїну визначали загальноприйнятим методом Лоурі.

Результати досліджень опрацьовували статистично з використання середнього арифметичного та стандартної похибки (M±m). Різницю показників оцінювали методами варіаційної статистики за критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності p≥0,95 (рівень значимості P<0,05).

Результати і їхнє обговорення

Методом імуноферментного аналізу було встановлено підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у S-фазі мітотичного циклу за умов ЕЦД у 3,9 разу, порівняно з контролем. Введення БФЕКЛ тваринам контрольної групи не призводило до статистично вірогідних змін досліджуваного показника, тоді як у тварин з ЕЦД його рівень знижувався у 2,8 разу щодо діабету (рис. 1).

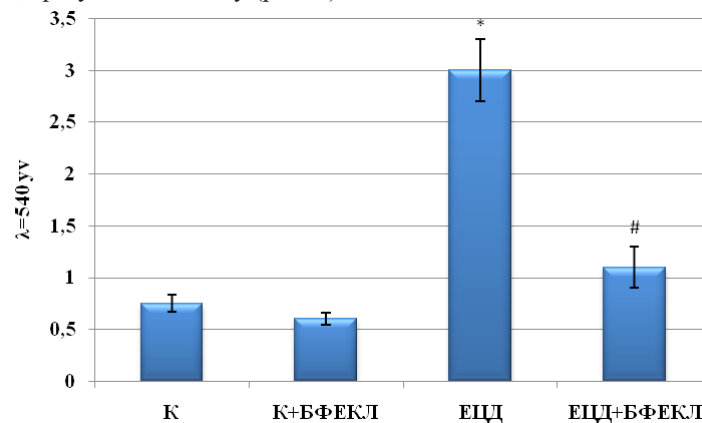


Рис. 1. Рівень включення в проліферуючі клітини аналога тимідину – 5-бром-2'-дезоксіуридину у нормі, при ЕЦД та за умов введення БФЕКЛ: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Для підтвердження коригуючого впливу БФЕКЛ на процеси проліферації та диференціації клітин білого ростка кісткового мозку на клітинному рівні нами було проведено цитологічні дослідження співвідношення клітин мієлоїдного та лімфоїдного рядів. Аналіз морфологічного складу клітин попередників нейтрофілів та лімфоцитів кісткового мозку дає змогу стверджувати, що встановлене нами підвищення проліферативної активності попередників лейкоцитів у тварин, хворих на діабет, відбувається завдяки збільшенню кількості лімфобластів. Вірогідне збільшення кількості лімфобластів (на 28,3 %) та зниження кількості лімфоцитів (17,3 %) при цій патології на фоні відсутності змін кількості лейкоцитів периферичної крові [14] свідчить про сповільнене дозрівання лімфобластів і є клітинним механізмом розвитку вторинного імунодефіциту за цієї патології. У разі введення БФЕКЛ тваринам контрольної групи не виявлено вірогідних змін кількості клітин лімфоїдного ряду, натомість застосування досліджуваного екстракту призводило до зниження кількості лімфобластів (на 15,5 %) та збільшення кількості лімфоцитів (на 31,1 %) у тварин з ЕЦД, що підтверджує його коригуючий вплив на процес проліферації клітин білого ростка кісткового мозку (табл. 1, рис. 1).

Розвиток ЕЦД супроводжувався зниженням кількості метамієлоцитів на 31 %, що призводило до зниження чисельності незрілих нейтрофілів на 31 %. Встановлений феномен можна пояснити прискороною елімінацією метамієлоцитів у периферичну кров або сповільненим дозріванням цих клітин. Це може бути опосередковано через зміну співвідношення медіаторів, які стимулюють диференціацію клітин-попередників у зрілі нейтрофіли, або через зміну фенотипу мієлоїдних клітин (зміну кількості рецепторів до цих медіаторів на поверхні плазматичної мембрани попередників мієлоїдного ряду). Нещодавні дослідження показали, що на ранніх стадіях ЦД може значно знижуватися рівень гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора, а розвиток мікроангіопатій і

порушення функціонального стану епітелію кровоносних судин може спричинити обмеження для дії колонієстимулюючих чинників навіть за умов, коли їхній рівень є у межах норми [17]. Нами не виявлено вірогідних змін у співвідношенні клітин мієлоїдного ряду кісткового мозку у відповідь на введення БФЕКЛ тваринам за умов діабету, проте відмічено зниження кількості мієлобластів, метамієлоцитів та сегментно-ядерних нейтрофілів при введенні цього екстракту тваринам контрольної групи (табл. 1).

Таблиця 1

Відсоткове співвідношення попередників нейтрофілів і лімфоцитів у кістковому мозку щурів у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення БФЕКЛ ($M \pm m$, $n=6$)

Тип клітин	Варіант досліджу			
	К	К +БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+ БФЕКЛ
Мієлоїдний ряд				
Мієлобласти, %	1,91±0,15	0,84±0,09*	1,46±0,12	1,26±0,09
Метамієлоцити, %	18,54±1,21	13,53±0,89*	12,78±1,39*	12,42±1,17
Юні та паличко-ядерні нейтрофіли, %	15,67±1,38	13,89±0,28	10,84±1,86*	13,04±0,83
Сегментно-ядерні нейтрофіли, %	1,58±0,14	0,56±0,07*	1,10±0,15	0,67±0,09
Базофіли усіх типів, %	0,19±0,12	0,11±0,08	0,44±0,05	-
Еозинофіли усіх типів, %	0,40±0,06	0,37±0,19	0,32±0,08	0,41±0,13
Лімфоїдний ряд				
Лімфобласти, %	34,31±1,74	38,56±2,07	49,48±2,67*	40,26±1,94#
Лімфоцити, %	27,40±3,03	32,13±2,85	23,60±2,36	30,95±1,81#

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

Важливу роль у регуляції гемопоєзу відіграє прозапальний цитокін ФНП- α , котрий є біфункціональним регулятором гемопоєзу, причому характер впливу на гемопоетичні клітини визначається стадією диференціації цих клітин, наявністю ростових чинників (ІЛ-3, чинника стовбурових клітин, гранулоцитарно-моноцитарного колонієстимулюючого чинника), а також кількісним вмістом ФНП- α .

У тварин з ЕЦД відмічено зростання концентрації ФНП- α у плазмі крові щурів (рис. 2). Не виключено, що підвищення концентрації цього цитокіну стимулювало процеси проліферації та диференціації попередників лімфоїдного ряду. Водночас аналіз мієлограми дає змогу стверджувати, що ФНП- α інгібує мієлопоез на рівні гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників. Одним із можливих механізмів такого інгібування може бути рецептор-опосередкована індукція апоптозу за участю ФНП- α та рецептора 1 ФНП [2]. За введення БФЕКЛ діабетичним тваринам відмічено зниження вмісту ФНП- α у плазмі крові до рівня контрольних значень, що супроводжується зниженням відсоткового вмісту лімфобластів (табл. 1, рис. 2).

Процеси проліферації та диференціації клітин імунної системи безпосередньо залежать від стану окисно-відновного потенціалу гемопоетичних клітин [22]. Редокс-баланс підтримується завдяки існуванню певного рівня генерації активних форм кисню і активності антиоксидантних систем у клітині. Як показали наші дослідження, у клітинах білого ростка кісткового мозку за умов ЕЦД знижується активність ключових ензимів антиоксидантного захисту – СОД (на 40 %), каталази (на 50 %) та ГПО (на 24 %), що супроводжується значним підвищенням вмісту ТБК-позитивних продуктів (у 4 рази) (табл. 2). Ці експериментальні дані підтверджують неспроможність антиоксидантної системи клітин попередників лейкоцитів реалізувати у повному обсязі захисні й адаптаційні механізми у разі оксидативного стресу, який виникає за досліджуваної патології. Згідно з даними літе-

ратури [20], оксидативний стрес помірної інтенсивності стимулює проліферацію клітин, тоді як високі концентрації активних форм кисню індукують їхню загибель шляхом апоптозу. Застосування БФ ЕКЛ за умов діабету сприяло мобілізації антиоксидантних механізмів захисту лейкоцитів.

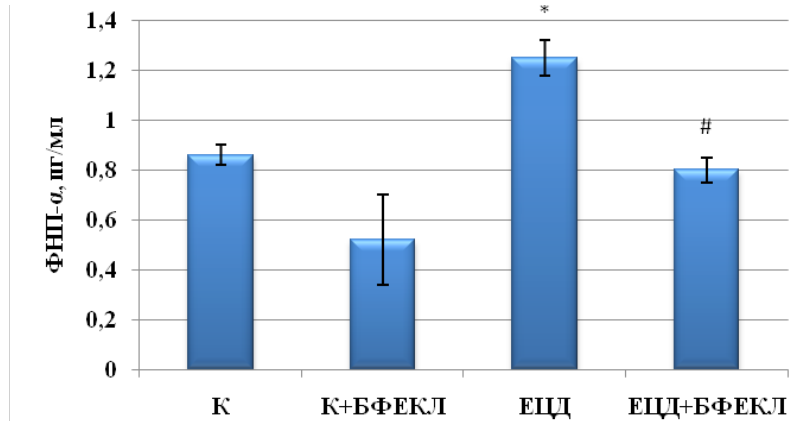


Рис. 2. Вміст ФНП- α у плазмі крові в нормі, за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам БФЕКЛ: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Таким чином, досліджуваний екстракт виявляє коригуючий вплив на проліферативну активність клітин лімфоїдного та мієлоїдного рядів кісткового мозку. Зниження проліферативної активності попередників лейкоцитів у разі введення БФ ЕКЛ тваринам з ЕЦД може бути опосередковано впливом цього екстракту на продукцію ТНФ- α та прояви оксидативного стресу.

Таблиця 2

Активність окремих ензимів системи антиоксидантного захисту у клітинах білого ростка кісткового мозку у нормі, за умов ЕЦД та при введенні БФ ЕКЛ ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Умови експерименту			
	К	К+БФЕКЛ	ЕЦД	ЕЦД+БФЕКЛ
СОД, U/мг протеїну	34,5 \pm 2,0	31,1 \pm 4,5	20,6 \pm 2,1*	23,1 \pm 1,3
Каталаза, нмоль H ₂ O ₂ /хв•мг протеїну	6,6 \pm 0,4	7,2 \pm 0,4	3,3 \pm 0,3*	5,9 \pm 0,2#
ГПО, мкмоль G-SH/хв•мг протеїну	2,1 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1*	2,5 \pm 0,3#
ТБК-ПП, нмоль•мг протеїну	1,4 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5*	2,9 \pm 0,3#

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

Як правило, у популяції клітин з високою проліферативною активністю кількість клітин в S-фазі клітинного циклу збільшується [15]. Чисельність клітин у цій фазі також може збільшуватися у відповідь на пошкодження ДНК і у разі диференціації в органах кровотворення. За умов відсутності повної репарації генетичного матеріалу відбувається загибель клітин у вогнищі кровотворення, периферичній крові або органах остаточного диференціювання і депонування. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів.

За умов стрептозотоцинового діабету встановлено збільшення індексу апоптозу в клітинах мононуклеарного (у 3,6 разу) та поліморфноядерного (у 4,8 разу) рядів периферичної крові, порівняно з контрольними тваринами (табл. 3). Це свідчить про те, що зрілі лімфоцити

та моноцити, які циркулюють у крові, є стійкішими до індукції апоптозу. Апоптоз нейтрофільних гранулоцитів усуває їхній надлишок у вогнищах ураження, уникаючи інтоксикації організму продуктами їхнього розпаду, що сприяє завершенню запального процесу у тканинах [19]. Індекс апоптозу МНЛ і ПМЯЛ контрольних тварин на фоні введення досліджуваного екстракту вірогідно не змінювався (табл. 3). Застосування БФ ЕКЛ призводило до суттєвого зменшення індексу апоптозу лейкоцитів у разі стрептозотоцинового діабету.

Характерною біохімічною ознакою апоптозу на рівні плазматичної мембрани клітин є транслокація молекул ФС із внутрішнього на зовнішній її бік [7]. Експонування ФС на зовнішній поверхні мембрани спостерігається, починаючи з ранньої стадії апоптозу до повної деградації клітини. Це використовується для диференціації нормальних життєздатних клітин від тих, у яких виявлена готовність до апоптозу. Застосування подвійного флуоресцентного фарбування клітин анексином V, міченим ФІТЦом та ПІЙ дає змогу здійснити детальну оцінку вираженості апоптотичних змін у лімфоцитах і отримати кількісний розподіл цих клітин крові на живі клітини на ранніх стадіях апоптозу та клітини на пізніх стадіях апоптозу.

Розвиток ЕЦД супроводжувався зростанням кількості анексин-позитивних клітин майже учетверо, порівняно з контролем, що свідчить про посилення екстерналізації ФС на поверхні лейкоцитів. Водночас кількість анексин-позитивних клітин, які давали також позитивну реакцію при фарбуванні пропідій йодидом, зростала у 2,8 разу (табл. 3). Це є ознакою порушення цілісності мембрани і свідчить про зростання кількості клітин із ранніми та пізніми ознаками апоптозу.

Таблиця 3

Співвідношення лейкоцитів з ознаками апоптозу у нормі, за умов ЕЦД та при введенні БФЕКЛ ($M \pm m$, $n = 6$)

Група тварин	Життєздатність клітин, %				Апоптотичний індекс, %	
	Живі клітини (АнексинV-/ПІЙ)	Клітини з ранніми ознаками апоптозу (АнексинV+/ПІЙ)	Клітини з пізніми ознаками апоптозу (АнексинV+/ПІЙ)	Клітини з ознаками некрозу (АнексинV-/ПІЙ)	МНЛ	ПМЯЛ
К	96,41±1,7	2,75±1,92	0,06±0,02	0,78±0,30	2,85±0,29	4,32±0,07
К+БФЕКЛ	99,51±0,07	0,11±0,04*	0,004±0,002*	0,38±0,06*	3,50±0,29	4,21±0,12
ЕЦД	87,56±1,12*	10,38±0,58*	0,16±0,07*	1,90±0,76	10,28±0,90*	20,92±1,09*
ЕЦД+БФЕКЛ	98,12±0,26 [#]	1,40±0,31 [#]	0,04 ± 0,02 [#]	0,44±0,07 [#]	3,23±0,11 [#]	5,87±0,19 [#]

Примітки: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$; [#] – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$.

Застосування БФЕКЛ призводить до зменшення кількості лейкоцитів з ознаками апоптозу у щурів контрольної групи та тварин з ЕЦД, що підтверджує його пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель цих клітин, інтенсивність якої значно підвищується за досліджуваної патології. Вираженість апоптотичних процесів у лейкоцитах узгоджується з характером змін вмісту ФНП-а. Тому не виключено, що протекторна дія екстракту значною мірою також може реалізуватися через пригнічення механізму рецептор-опосередкованого апоптозу в лейкоцитах. Той факт, що застосування досліджуваного екстракту запобігає розвитку оксидативного стресу в лейкоцитах може свідчити про існування й інших додаткових механізмів його коригуючого впливу. Зокрема, ще одним з аспектів реалізації антиапоптотичної дії БФЕКЛ може бути пригнічення мітохондріального шляху апоптозу, який активується в умовах оксидативного стресу.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок про те, що виникнення оксидативного стресу в клітинах білого ростка кісткового мозку за умов ЕЦД призводить до підвищення їхньої проліферативної активності. Ймовірно, що підвищення рівня проліферації клітин кісткового мозку щурів при захворюванні на ЦД призводить до індукції апоптозу зрілих лейкоцитів як способу елімінації потенційно реактивних клітин.

Встановлений нами коригуючий вплив БФЕКЛ на проліферативну активність клітин-попередників лейкоцитів за ЕЦД може бути опосередкований гіпоглікемічною (фітол (3,68 %), етиловий естер пальмітинової кислоти (15,48 %), фітостероли – кампестерол (1,97 %) і стигмастерол (14,73 %), похідні хіназоліну (2,89 %)), антиоксидантною ((фітол (3,68 %), флавоноїди (2,98 %) вітамін Е (0,46 %)) та протизапальною (флавоноїди (2,98 %), метиловий естер ліноленої кислоти (33,03 %), α -амірин (1,93 %)) дією компонентів, наявних у його складі [13].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Грунова К.М., Моторна М.М. Апоптоз моноклеарних клітин крові у хворих з патологією серцево-судинної системи // Лаб. діагностика. 2004. № 1. С. 16–18.
2. Друцкая М.С., Купраш Д.В., Недоспасов С.А. и др. Кроветворение у мышей, дефицитных по фактору некроза опухоли: аномалии, выявляемые в длительной культуре костного мозга // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2001. Т. 131. С. 184–187.
3. Королюк М. А., Иванова И. Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. Т. 1. С. 16–18.
4. Лаповець Л. Лабораторна імунологія. К.: Арал, 2004. 173 с.
5. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. Т. 12. С. 124–126.
6. Никонова Т.В. Современные аспекты патогенеза сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. 2006. № 3. С. 59–64.
7. Остапченко Л.Л., Синельник Т.Б. Біохімічні механізми апоптозу. К.: Київський університет, 2010. 312 с.
8. Пат. 101202 Україна. Спосіб отримання фітопрепарату на основі безалкалоїдної фракції екстракту козлятнику лікарського (*Galega officinalis* L.) / Сибірна Н.О., Вільданова Р.І., Шульга О.М., Щеглова Н.С., Карпенко О.В., Хохла М.Р., Гачкова Г.Я., Лупак М.І. Заявл. 06.04.2015; Опубл. 25.08.2015; Бюл. № 16. 6 с.
9. Пат. 96839 Україна. Спосіб одержання безалкалоїдного екстракту з козлятника лікарського з антидіабетичною дією / Сибірна Н.О., Гачкова Г.Я., Хохла М.Р. (Україна) Заявл. 15.07.2014; Опубл. 25.02.2015; Бюл. № 4. 5 с.
10. Пекарева Е.В., Никонова Т.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. 2010. № 1. С.45–48.
11. Сибірна Н.О. Методи дослідження системи крові: навч.-метод. посіб. Л.: Вид. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2005. 100 с.
12. Тимирбулатов Р.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981.Т. 4. С. 209–211.
13. Хохла М., Клевета Г., Лупак М. та ін. Дослідження компонентного складу екстракту козлятника лікарського // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Т. 62. С. 55–60.
14. Хохла М., Клевета Г., Чайка Я. та ін. Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської // Біол. студії. 2012. Т. 6, № 1. С. 3–46.

15. Чак Т.А., Сорокина В.Н. Оценка молекулярно-биологических показателей лейкоцитов периферической крови пациентов с дистальной сенсомоторной нейропатией при сахарном диабете 2-го типа // Междунар. эндокрин. журн. 2015. Т. 5. № 69. С. 1–11.
16. Чевари С., Андял Т. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте // Лаб. дело. 1991. Т. 10. С. 9–13.
17. Alnek K., Kisand K., Heilman K., et al. Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, № 12. P. 1–16.
18. Cohen J. John. Apoptosis // ImmunologyToday. 1993. Vol. 14. № 3. P. 126–130.
19. Laskay T., van Zandbergen G., Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor // Immunobiol. 2008. Vol. 213, № 3–4. P. 183–191.
20. McCord J. M. Superoxide radical: controversies, contradictions and paradoxes // Proc. Soc. Exptl Biol. and Med. 1995. Vol. 209. № 2. P. 112–117.
21. Shurtz-Swirski R. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients // Diabetes Care. 2001. Vol. 24. P. 104–110.
22. Tothova Z., Kollipara R., Huntly B.J., Lee B.H. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress // Cell. 2007. Vol. 128. № 2. P. 325–339.

*Стаття: надійшла до редакції 28.07.16
доопрацьована 2.09.16
прийнята до друку 5.09.16*

EFFECT OF ALKALOID-FREE FRACTION OF *GALEGA OFFICINALIS* L. EXTRACT ON LEUKOCYTES PRECURSORS PROLIFERATIVE ACTIVITY UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

H. Hachkova¹, Ya. Chajka¹, R. Vildanova², O. Shulga², 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., Lviv 79060, Ukraine
e-mail: klevetag@gmail.com*

In the article the data about the impact of alkaloid-free fraction of *Galega officinalis* L. extract (AFFGOE) on proliferative activity of rats' bone marrow precursors of white blood cells under experimental diabetes mellitus (EDM) are shown. It was found intensification of proliferation and differentiation processes of leukocyte precursor cells and the development of oxidative stress under studied pathology. Likewise the content of tumor necrosis factor α (TNF- α) in blood plasma and the number of peripheral blood leukocytes with the features of apoptosis were increased. Administration of alkaloid-free fraction of *Galega officinalis* L. extract caused a corrective effect on hematopoiesis process in the case of streptozotocin induced diabetes. This effect was confirmed by the changes of indices of proliferation and differentiation of white blood cells bone marrow precursors. It was shown regulatory effect of investigated extract on the antioxidant-prooxidant balance, the content of TNF- α and the suppression of apoptosis process of peripheral blood leukocytes. Biologi-

cal activity of *Galega officinalis* extract may be associated with hypoglycemic, antioxidant and anti-inflammatory properties of the components, which are included in its composition.

Keywords: alkaloid-free *Galega officinalis* L. extract, diabetes mellitus, proliferative activity, leukocytes, apoptosis.

ВЛИЯНИЕ БЕЗАЛКАЛОИДНОЙ ФРАКЦИИ ЭКСТРАКТА *GALEGA OFFICINALIS* L. НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Г. Гачкова¹, Я. Чайка¹, Р. Вильданова², А. Шульга², Н. 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 имени Л.М. Литвиненко НАН Украины
ул. Научная, 3а, Львов 70060, Украина
e-mail: klevetag@gmail.com

В статье представлены данные о влиянии безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной (БФЭГЛ) (*Galega officinalis* L.) на пролиферативную активность предшественников лейкоцитов крыс в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭЦД). Повышение уровня пролиферации и дифференциации клеток лимфоидного и миелоидного ряда костного мозга при исследуемой патологии сопровождалось развитием окислительного стресса в этих клетках, повышением содержания фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в плазме крови, а также увеличением количества лейкоцитов периферической крови с признаками апоптоза. Введение БФЭГЛ корригирует нарушения процесса кроветворения в условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета, что подтверждалось изменениями показателей пролиферации и дифференциации предшественников лейкоцитов. Исследуемый экстракт регулирует прооксидантно-антиоксидантное равновесие, содержание ФНО- α , а также процесс апоптоза лейкоцитов периферической крови. Биологическое действие БФЭГЛ может быть обусловлено подтвержденными гипогликемическими, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами входящих в его состав компонентов.

Ключевые слова: безалкалоидная фракция экстракта галеги лекарственной, сахарный диабет, пролиферативная активность, лейкоциты, апоптоз.