

ВПЛИВ ГАЛЕГИ ЛІКАРСЬКОЇ НА АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

М. Хохла, Г. Клевата, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна

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

У статті наведені дані про вплив екстракту галеги лікарської на апоптоз лейкоцитів щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД). Імуноцитохімічним методом за патологічних умов показано кількісний перерозподіл лейкоцитів, які містять білки-регулятори апоптозу – p53 і Bcl-2. Це супроводжується посиленням фрагментації ДНК. Застосування екстракту галеги лікарської за умов ЕЦД нормалізує співвідношення лейкоцитів, які містять білки p53 і Bcl-2, та гальмує фрагментацію ДНК, що свідчить про пригнічувальний вплив даного екстракту на генетично запрограмовану загибель клітин. Встановлений коригуючий ефект досліджуваного екстракту на процеси апоптозу можна пов'язати з антиоксидантною дією біологічно активних речовин, наявних у складі галеги лікарської.

Ключові слова: галега лікарська, цукровий діабет, апоптоз, лейкоцити.

Цукровий діабет 1 типу (ЦД) – органоспецифічне аутоімунне захворювання, що розвивається внаслідок селективного руйнування β -клітин підшлункової залози цитотоксичними лімфоцитами, Т-хелперами і аутоантитілами [10]. У результаті поступової деструкції β -клітин виникає інсулінова недостатність, що призводить до порушення гомеостазу глюкози та виникнення ЦД.

Ключовим моментом в ініціації ЦД є резистентність аутореактивних Т-лімфоцитів до апоптозу. Аутореактивні лімфоцити, які є стійкими до апоптозу, мігрують із кров'яного русла до органа-мішені – підшлункової залози, де утворюють запальні інфільтрати – інсуліти. Імунокомпетентні клітини, які інфільтрують острівкову тканину, продукують прозапальні цитокіни (ФНП- α , ІФН γ), оксид азоту, активні форми кисню, цитотоксичні ферменти (перфорин і гранзим В) та інші сполуки, що викликають загибель β -клітин за механізмом апоптозу [5].

У сучасній літературі відомо понад 150 видів лікарських рослин, які застосовують для лікування ЦД. З огляду на поліфункціональну фізіологічну дію, особливої уваги заслуговує галега лікарська (*Galega officinalis* L.) [1, 6, 12, 20, 22]. Використання фітопрепаратів при ЦД спрямоване на нормалізацію обміну вуглеводів, реологічних властивостей крові, пригнічення апоптозу і стимуляцію регенерації β -клітин, а також мінімізацію побічних ефектів фармако-терапії. У літературі наведені дані про те, що пролонговане використання галеги лікарської сприяє регенерації β -клітин острівців Лангерганса [21]. Не виключено, що такий ефект може бути обумовлений пригніченням апоптотичної загибелі клітин, зокрема за умов ЦД.

Метою роботи було з'ясувати вплив біологічно активних речовин, які містяться в екстракті галеги лікарської, на процеси апоптотичної загибелі імунокомпетентних клітин периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД.

Матеріали та методи

Досліди проведено на білих безпородних щурах з масою тіла 100–150 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням етичних норм проведення експериментальних досліджень згідно із „Загальними принципами роботи на тваринах”, затвер-

дженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження” від 26.02.2006 р.

ЕЦД 1-го типу індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину, який є нітрозопохідним глюкозаміну (“Sigma”, США) з розрахунку 5,5 мг на 100 г маси тіла. Для експерименту використовували тварин із рівнем глюкози вище $14,09 \pm 1,44$ ммоль/л (після 18-годинного голодування). Концентрацію глюкози у крові визначали глюкозооксидазним методом (набір реактивів “Діаглюк” для визначення концентрації глюкози люб’язно надано проф. М. В. Гончаром (Інститут біології клітини НАН України, м. Львів). Через два тижні після індукції ЦД тваринам *per os* вводили екстракт галеги лікарської впродовж 14 діб.

Отримання екстракту галеги лікарської та розділення його на алкалоїдовмісну і безалкалоїдну фракції було проведено згідно з протоколом, який описано нами раніше [11]. Для дослідження використовували хлороформу (безалкалоїдну) фракцію етанольного екстракту галеги лікарської (у вигляді густої непрозорої маси темно-зеленого кольору). Одержаний екстракт вводили у вигляді водної суспензії, у дозі 0,6 г на 1 кг маси тіла тварини, в об’ємі 1 мл.

Для первинної характеристики одержаного екстракту галеги лікарської нами було проведено низку якісних реакцій, за допомогою яких ми підтвердили відсутність алкалоїдів та наявність флавоноїдів і сапонінів у його складі. Зокрема, використавши загальноосадові реакції (із застосуванням реактивів Майєра, Драгендорфа, Бушарда, Зоненштейна) [4], ми підтвердили відсутність алкалоїдів в одержаному екстракті. Для підтвердження наявності флавоноїдів у складі ЕГЛ було проведено реакцію з ацетатом свинцю (утворення жовтого кольору) та реакцію з борною кислотою у присутності цитратної кислоти (утворення осаду яскраво-жовтого кольору) [4]. Якісна реакція піноутворення з гідроксидом натрію та хлоридною кислотою свідчить про наявність сапонінів у складі отриманого екстракту.

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини філол-тріомбразу ($\rho = 1,076 - 1,078$ г·см⁻³) шляхом центрифугування при 1000 об/хв (35 хв) [7]. Отримані клітини двічі відмивали у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) (рН=7,4) впродовж 5 хв при 1500 об/хв.

Біохімічна детекція апоптозу за визначенням вмісту фрагментованої ДНК [8]. Лізис клітин (5 млн клітин у 50 мкл) проводили впродовж 30 хв на льодяній бані лізуючим буфером такого складу: 5 мМ трис-НСІ, 20 мМ EDTA (рН 8), 0,5% тритон X-100. Аліквоту кожної проби центрифугували (15 хв при 12000 об/хв), відділяючи інтактний хроматин (в осаді) від фрагментованої ДНК (у супернатанті). Далі кожну фракцію ресуспендували в 500 мкл ТЕ-буферу (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ EDTA, рН 8,0) і додавали по 600 мкл 1н НСІО₄, зразки охолоджували при -4°C (20 хв). Одержані суспензії центрифугували (10 хв при 6700 об/хв). Супернатант відкидали. У пробірці з осадом додають по 300 мкл 1н НСІО₄ і проводять гідроліз на водяній бані при 70°C протягом 20 хв. Потім обережно відбирають супернатант. Після охолодження в пробірці з супернатантом додавали дифеніламіновий реагент в об’ємному співвідношенні 1:2. Зразки поміщали у темне місце на 17 годин. Проби спектрофотометрували при довжині хвилі 570 нм. Ступінь пошкодження ДНК обчислювали у відсотках як відношення її кількості в супернатанті до сумарного вмісту в осаді та супернатанті.

Імуноцитохімічна детекція вмісту проапоптичного білка p53 і антиапоптичного білка Bcl-2. Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних білків Bcl-2 і p53 використовували непрямий імунопероксидазний метод [2]. Лейкоцити, нанесені на предметне скло, фіксували у розчині метанолу при температурі -4°C впродовж 20 хв та кілька секунд в охолодженому ацетоні. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,1% тритоном X-100 у ЗФР. Для бло-

кування ендогенної клітинної пероксидази препарати інкубували в 0,3% розчині H_2O_2 (5 хв). Блокування вільних центрів зв'язування проводили шляхом інкубації з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Sigma, США) та негативним контролем "Negative control reagent" (ДАКО, США) для блокування імуноглобулінподібних молекул. Для детекції білків p53 та Bcl-2 клітини інкубували з моноклональними антитілами до p53 (ДАКО, США; клон DO-7, ізотип IgG_{2b}) та моноклональними антитілами до Bcl-2 (ДАКО, США; клон 124, ізотип IgG_1) у ЗФР (1:25), що містив 1% БСА впродовж 2 годин при 4°C. Зразки відмивали у ЗФР з 0,05% тритоном X-100 та інкубували з другими біотинільованими антитілами "LSAB[®]2 Biotinylated Link for Streptavidin HRP/AP", (ДАКО, США) у ЗФР (1:10), що містить 1% БСА впродовж 1 год при кімнатній температурі. Інкубацію з антитілами проводили у вологій камері. Після відмивання у ЗФР, що містив 0,05% тритон X-100 та ЗФР зразки інкубували впродовж 30 хв із авідин-біотин-пероксидазним комплексом "ExtrAvidin Peroxidase" (Sigma, США) у розведенні 1:125. Кольорову реакцію для детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3-амінобензидину "Liquid DAB Substrate Chromogen system" (ДАКО, США).

Аналіз вмісту білків p53 у ядрі та Bcl-2 на зовнішній мембрані мітохондрій і в ендоплазматичному ретикулумі лейкоцитів периферичної крові щурів здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням $\times 40$ акропланового об'єктива мікроскопа MICROmed XS-5520 та відеокамери для мікроскопа (DCM310) з програмним забезпеченням (ScorePhoto). За інтенсивністю забарвлення досліджувані клітини були поділені на 3 групи: з негативною реакцією (p53⁻ та Bcl-2⁻), позитивною (p53⁺ та Bcl-2⁺) та різко позитивною (p53⁺⁺ та Bcl-2⁺⁺) реакцією. Негативними контролями специфічності зв'язування слугували клітини без використання як перших, так і других антитіл. На препараті підраховували 500 досліджуваних клітин за вищезазначеною схемою. Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що за умов ЕЦД підвищується кількість p53⁺ (на 18%) та p53⁺⁺ клітин на (269%), порівняно з контролем, водночас знижується чисельність p53⁻ клітин (на 21%) (табл. 1). Ці дані вказують на інтенсифікацію апоптозу й узгоджуються з дослідженнями інших авторів, щодо участі білка p53 в патогенезі діабетичних ускладнень. На мишах лінії Nod було показано, що гіперглікемія призводить до p53-опосередкованого апоптозу [18], а у хворих на ЦД 1 типу в сироватці крові виявляються анти-p53-аутоантитіла та збільшується інтенсивність p53-індукованого апоптозу [17].

Вміст p53 різко підвищується за впливу різних стресових чинників. Білок p53 не тільки здатний активувати гени, які задіяні в індукції апоптозу, а й бере безпосередню участь в індукції мітохондріального шляху клітинної смерті. Після активації p53 здатний надходити з цитоплазми в мітохондрії, оминаючи ядро. У мітохондріях даний білок піддається швидкому ферментативному деубіквітинуванию, перетворюється в активну форму та вступає у взаємодію з BH4-доменом антиапоптичних білків Bcl-XL і Bcl-2 [13]. Зв'язування з антиапоптичними білками індукує вивільнення і активацію проапоптичних протеїнів Bax та Bid. Такі взаємодії зумовлюють вихід цитохрому c та індукцію апоптозу навіть без транскрипційної активації проапоптичних генів мішеней p53. Пряма індукція апоптозу під дією p53, мабуть, є першою і дуже швидкою реакцією на масивні ушкодження. Друга хвиля індукції апоптозу відбувається тільки через 6–7 годин і пов'язана з транскрипційною активністю p53 в ядрі [15, 16]. Таким чином, діючи відразу на кількох рівнях і за різними механізмами, p53 як здійснює швидкі реакції-відповіді на сильні стреси, так і реалізує сповільнену, але дуже ефективну програму апоптозу пошкоджених клітин.

Введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД, викликало зниження кількості p53⁺- в середньому на 24% (9–14-та доби) та p53⁺⁺-клітин на 74% (6–14-та доби) та підвищення кількості p53⁻-клітин на 36% (9–14-та доби). При цьому слід зазначити, що у здорових тварин даний екстракт виявляв подібний вплив лише на окремих етапах експерименту (9-та доба) (табл. 1, рис. 1).

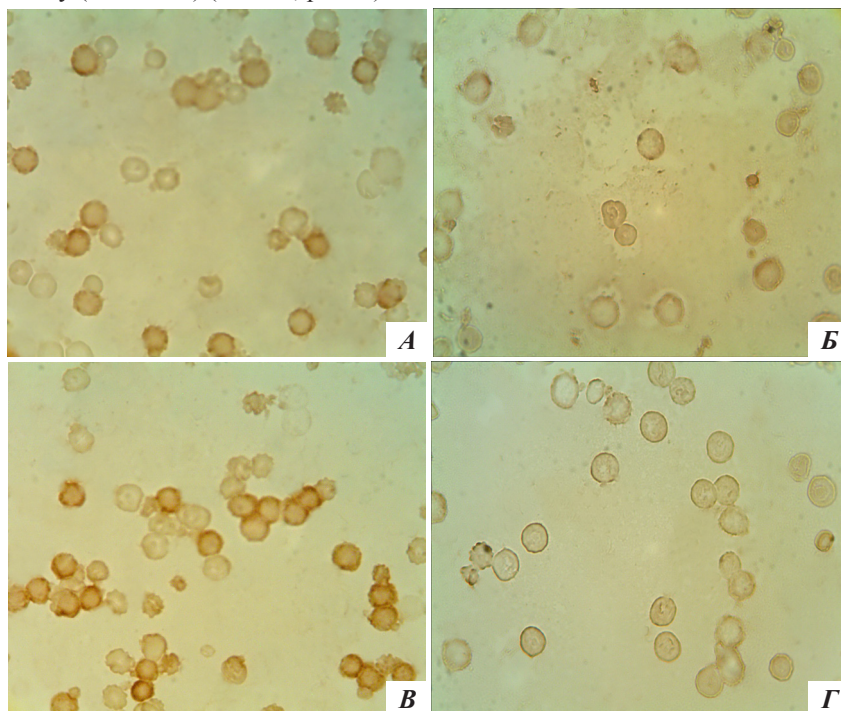


Рис. 1. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів на вміст білка p53 у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8): А – контроль; Б – введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам; В – ЕЦД; Г – введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД.

Для з'ясування біохімічних механізмів розвитку апоптозу принципове значення має дослідження дії факторів, які здатні запобігати включенню програми загибелі. Значний інтерес у цьому плані становить продукт онкогену bcl-2. Білок Bcl-2 є важливим репресором апоптозу. Відомо, що Bcl-2 інгібує p53-залежний і незалежний шляхи апоптозу. При цьому він сприяє утворенню у мітохондріях іонних каналів, стабілізуючи таким чином мітохондріальну цитохром с-оксидазу і зв'язує білки, які задіяні в апоптозі. Цитохром с-оксидаза здатна ініціювати активацію каскаду каспаз і, як наслідок, деградацію ДНК і апоптоз [3].

Привертає увагу одночасне збільшення кількості клітин, що містять білки-регулятори апоптозу з протилежними функціями – проапоптичного білка p53 і антиапоптичного Bcl-2. Так, у разі стрептозотоцинового діабету на фоні зростання кількості лейкоцитів із підвищеним вмістом проапоптичного білка p53, нами визначено зростання кількості Bcl-2⁺ - та Bcl-2⁺⁺-клітин відповідно на 23 та на 143% і зниження Bcl-2⁻-клітин на 16%. Отримані результати вказують на синергізм дії білків p53 і Bcl-2 у регуляції запрограмованої клітинної смерті за умов цукрового діабету й узгоджуються з літературними даними. Зокрема, у роботі І. В. Гриневич показано односпрямовану тенденцію щодо збільшення кількості p53⁺- и Bcl-2⁺-клітин у лімфоїдних фолікулах селезінки при ЕЦД [3].

Таблиця 1

Співвідношення лейкоцитів периферичної крові щурів, які містять білок p53, у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8)

Умови експерименту	Співвідношення клітин із різним вмістом білка p53, %		
	p53 ⁻	p53 ⁺	p53 ⁺⁺
Контроль	56,03±2,98	42,50±3,09	1,47±0,12
Введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам			
3 доба	59,11±1,46	39,31±1,76	1,59±0,30
6 доба	56,61±3,50	41,59±3,46	1,80±0,23
9 доба	61,82±2,41	36,87±2,28	1,31±0,08
12 доба	56,65±3,00	41,58±2,86	1,50±0,09
14 доба	58,12±1,52	40,99±1,60	1,89±0,10
Діабет	44,35±2,39 *	50,22±2,83 *	5,42±0,36 *
Введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД			
3 доба	49,75±1,84 *	46,58±1,47	3,67±0,43 *#
6 доба	47,83±3,11 *	50,53±4,91	1,66±0,40 #
9 доба	60,17±3,95 #	38,28±4,28 #	1,55±0,16 #
12 доба	61,11±0,80 #	37,91±1,03 #	0,98±0,07 #
14 доба	59,79±2,03 #	38,79±2,33 #	1,42±0,22 #

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

На фоні зниження кількості лейкоцитів, що містять білок p53, у тварин із цукровим діабетом, яким вводили екстракт галеги лікарської, показано зростання Vcl-2⁺-клітин лише на початковому етапі експерименту – на 3–6-ту доби (на 8%). Вірогідне підвищення Vcl-2⁺-клітин у здорових тварин, яким вводили екстракт, відзначено на більш пізньому етапі – на 12-14-ту доби (на 17%). Водночас чисельність Vcl-2⁺⁺-клітин знижувалася впродовж експерименту як у здорових, так і у діабетичних тварин (табл. 2, рис. 2).

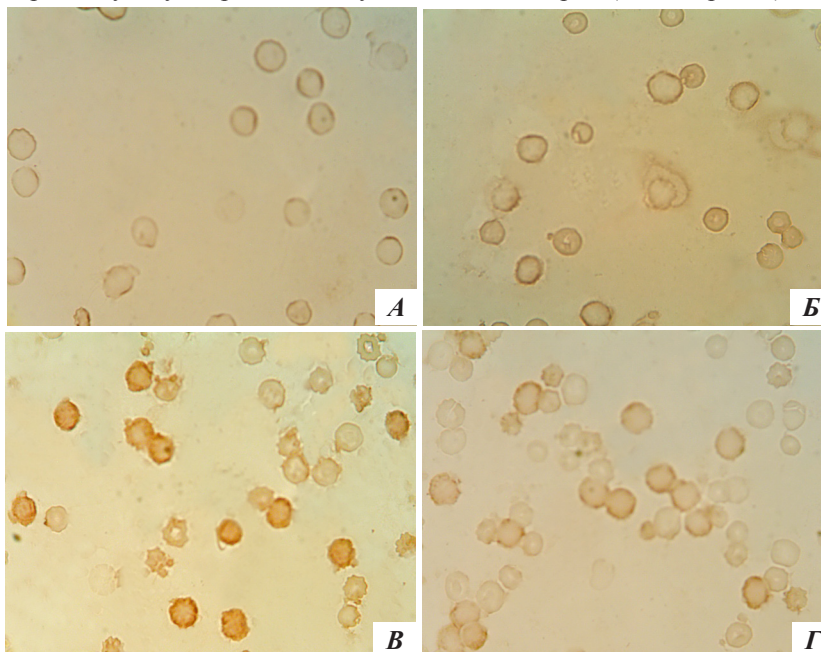


Рис. 2. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів на вміст білка Vcl-2 у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8): А – контроль; Б – введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам; В – ЕЦД; Г – введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД.

Таблиця 2

Співвідношення лейкоцитів периферичної крові щурів, які містять білок Bcl-2, у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8)

Умови експерименту	Співвідношення клітин, із різним вмістом білка Bcl-2, %		
	Bcl-2 ⁻	Bcl-2 ⁺	Bcl-2 ⁺⁺
Контроль	62,66±2,39	35,90±2,19	1,45±0,13
Введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам			
3 доба	59,86±1,18	39,07±1,38	1,07±0,17
6 доба	57,91±2,95	40,30±3,14	1,80±0,16
9 доба	59,26±2,36	39,73±2,23	1,01±0,19
12 доба	55,23±3,50 *	43,00±3,40 *	1,78±0,12
14 доба	58,06±2,87	41,11±2,86 *	0,83±0,07 *
Діабет	52,38±2,59 *	44,11±2,34 *	3,52±0,36 *
Введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД			
3 доба	51,79±0,30 *	46,13±0,36 *	2,08±0,24 #
6 доба	49,22±3,26 *	49,34±2,14 *	1,45±0,22 #
9 доба	58,91±0,92	39,32±1,47	1,77±0,16 #
12 доба	62,08±3,77 #	36,87±3,89 #	1,05±0,27 #
14 доба	60,15±1,01 #	38,94±1,64 #	1,46±0,09 #

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

Одним із низки біохімічних проявів апоптозу є фрагментація ДНК. З метою загальної оцінки інтенсивності фрагментації ДНК було проведено кількісне спектрофотометричне визначення вмісту низькомолекулярних фрагментів ДНК.

За умов цукрового діабету підвищувався вміст фрагментованої ДНК у лейкоцитах щурів у 2,4 разу, щодо контролю. Дія екстракту галеги лікарської (14-денний курс) гальмувала фрагментацію ДНК у діабетичних тварин у середньому на 29%, тоді як у контрольних тварин вміст даного показника незначно підвищувався (на 16%) (рис. 3).

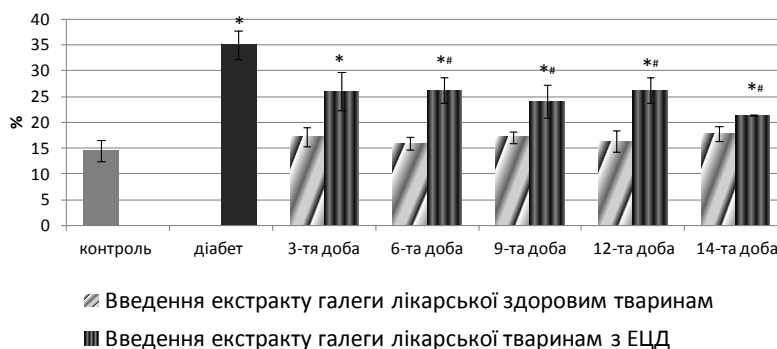


Рис. 3. Динаміка змін вмісту фрагментованої ДНК у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов введення екстракту галеги лікарської здоровим і діабетичним тваринам. **Примітка.** * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05.

Таким чином, отримані результати вказують на посилення апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов ЕЦД, що виявляється у порушенні кількісного співвідношення лейкоцитів, які відрізняються за вмістом білків регуляторів апоптозу, а також у підвищенні інтенсивності фрагментації ДНК. Дія галеги лікарської за умов цукрового діабету спрямована на нормалізацію співвідношення лейкоцитів, що містять про- (p53) і антиапоптотичний (Bcl-2) білки, а також зниження ступеня фрагментації

ДНК, що свідчить про пригнічувальний вплив досліджуваного екстракту на генетично запрограмовану загибель клітин. Відомо, що хронічна гіперглікемія за умов ЦД призводить до неферментативного глікозилювання білків і розвитку оксидативного стресу, в ході якого утворюються продукти, що виявляють потужну проапоптотичну дію [9]. Встановлений біологічний ефект галеги лікарської ми пов'язуємо з антиоксидантними властивостями, які виявляє дана рослина, оскільки численними дослідженнями показано захисний ефект антиоксидантів у процесі апоптозу [1, 14, 19].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажунова Т. А., Маркизов П. В. Антидиабетическая активность Галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.) // Хим.-фарм. журнал. 1994. Т. 28. №6. С. 35–36.
2. Беркало Л. В., Бобович О. В., Боброва Н. О. та ін. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава: Полімет, 2003. 320 с.
3. Гриневич И. В., Камышный А. М. Влияние экспериментального сахарного диабета на экспрессию белков-регуляторов апоптоза p53 и Bcl2 в лимфоидных фолликулах селезенки // Морфология. 2010. Т. 4. № 4. С. 19–23.
4. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т. І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. Харків: Прапор, 2000. 704 с.
5. Колесник Ю. М., Орловский М. А. Современные представления об анатомо-физиологических особенностях островков Лангерганса и механизмах их деструкции при сахарном диабете I типа // Запорож. мед. журнал. 2000. № 3. С. 3–11.
6. Лапынина Л. А. Выделение и изучение физиологически активных соединений галеги лекарственной как сырья для получения сахароснижающего препарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1972. 15 с.
7. Лаповець Л., Луцик Б. Лабораторна імунологія. К.: Арал, 2004. 173 с.
8. Орлова Е. А., Комаревцев В. Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // Актуальные проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии и медицинской генетики. 2001. Т. 6. С. 206–209.
9. Пащковська Н. В. Динаміка показників інтенсивності апоптозу у хворих на діабетичну енцефалопатію на тлі застосування цитиколіну // Укр. невролог. журнал. 2009. № 2. С. 43–48.
10. Хаитов Р. М., Игнатъева Г. Л., Сидорович И. Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000. 432 с.
11. Хохла М. Р., Клевета Г. Я., Чайка Я. П. та ін. Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2012. 6(1). С. 37–46.
12. Якимова Т. В., Булкова В. Н., Ухова Т. М. Влияние галеги лекарственной на течение экспериментального сахарного диабета // Бюлл. сибирской медицины. 2006. С. 146–147.
13. Braithwaite A., Royds J., Jackson P. The p53 story: layers of complexity // *Carcinogenesis*. 2005. Vol. 26. P. 1161–1169.
14. Briehl M. M., Cotgreave I. A., Powis G. Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis // *Cell Death Differ.* 1995. Vol. 2. P. 41–46.
15. Erster S., Mihara M., Kim R. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24. P. 6728–6741.
16. Janicke R. U., Sohn D., Schulze-Osthoff K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53 // *Cell Death and Differentiation*. 2008. Vol. 15. P. 959–976.

17. Jazayeri L., Callaghan M., Grogan R. et al. Diabetes increases p53-mediated apoptosis following ischemia // *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008. Vol. 121. P. 1135–1143.
18. Keim A., Chi M., Moley K. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53 // *Molecular Reproduction and Development*. 2001. Vol. 60. P. 214–224.
19. Kiselova Y., Ivanova D., Galunska B. et al. Polyphenol content and in vitro antioxidant activity of aqueous-alcoholic extracts from Bulgarian herbs // *Bulletin of the Medical Institute After Mehrabyan*. 2006. Vol. 1. P. 78–83.
20. Lemus I., Garcí'a R., Delvillar E., Knop G. Hypoglycaemic Activity of Four Plants Used in Chilean Popular Medicine // *Phytotherapy Research*. 1999. Vol. 13. P. 91–94
21. Sendrail M., Vincent D., Sendrail-Pesque M., Mahoux M. Experimental study of the action of plant drugs with a glycogenic effect on the cytological structure of the insular pancreas // *Sem Hop*. 1961. Vol. 2. N 37. P. 389–398.
22. Witters L. A. The blooming of the French lilac // *J. Clin. Invest*. 2001. Vol. 108. P. 1105–1107.

Стаття: надійшла до редакції 09.07.12

доопрацьована 29.10.12

прийнята до друку 30.10.12

THE INFLUENCE OF GALEGA OFFICINALIS ON RATS LEUKOCYTES APOPTOSIS UNDER THE EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 1

M. Khokhla, G. Kleveta, Ya. Chajka, M. Skybitska, N. Sybirna

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

The article contains data on the influence of Galega officinalis extract on rats leukocytes apoptosis in normal and under experimental diabetes mellitus (EDM). Immunohistochemistry method shows the quantitative redistribution of white blood cells that contain proteins, regulators of apoptosis – p53 and Bcl-2 under these pathological conditions. This is accompanied by increased DNA fragmentation. Application Galega officinalis extract under EDM normalizes ratio of leukocytes containing proteins p53 and Bcl-2 and inhibits DNA fragmentation, indicating the depressant effect of the extract on genetically programmed cell death. Corrective effect of the studied extract on the apoptosis processes can be associated with antioxidant action of Galega officinalis biologically active substances.

Keywords: Galega officinalis, diabetes mellitus, apoptosis, leukocytes.

ВЛИЯНИЕ ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НА АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

М. Хохла, Г. Клевета, Я. Чайка, М. Скибицкая, Н. Сибирная

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

В статье приведены данные о влиянии экстракта галеги лекарственной на апоптоз лейкоцитов крыс в норме и в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭСД). Иммуноцитохимическим методом при патологических условиях показано количественное перераспределение лейкоцитов, содержащих белки-регуляторы апоптоза – p53 и Bcl-2. Это сопровождается усилением фрагментации ДНК. Применение экстракта галеги лекарственной в условиях ЭСД нормализует соотношение лейкоцитов, которые содержат белки p53 и Bcl-2 и тормозит фрагментацию ДНК, что свидетельствует об угнетающем влиянии данного экстракта на генетически запрограммированную гибель клеток. Установленный корректирующий эффект исследуемого экстракта на процессы апоптоза можно связать с антиоксидантным действием биологически активных веществ, присутствующих в составе галеги лекарственной.

Ключевые слова: галега лекарственная, сахарный диабет, апоптоз, лейкоциты.