

УДК: 616.379-008.64:599.323.45.:591.111.1.633.881

М. І. ЛУПАК, О. П. КАНЮКА, Г. Я. КЛЕВЕТА, Я. П. ЧАЙКА, М. І. СКИБЦЬКА,
Н. О. СИБІРНА

Львівський національний університет імені Івана Франка

ВПЛИВ БЕЗАЛКАЛОЇДНОЇ ФРАКЦІЇ ЕКСТРАКТУ КОЗЛЯТНИКА ЛІКАРСЬКОГО НА ВМІСТ БІЛКІВ P53 ТА BCL-2 У МОНОНУКЛЕАРНИХ ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ

Імуноцитохімічним методом показано кількісний перерозподіл мононуклеарних лейкоцитів (МНЛ) периферичної крові щурів, що містять проапоптичний білок p53 і антиапоптичний білок Bcl-2 за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД) 1 типу. Застосування безалкалоїдної фракції екстракту козлятника лікарського (БФ ЕКЛ) за умов ЕЦД нормалізує співвідношення мононуклеарних лейкоцитів, які містять вищезазначені білки-регулятори апоптозу, що свідчить про пригнічувальний вплив БФ ЕКЛ на запрограмовану загибель імунокомпетентних клітин. Антиапоптичний ефект досліджуваного екстракту можна пояснити антиоксидантною дією біологічно активних речовин, що входять до його складу.

Ключові слова: козлятник лікарський, цукровий діабет 1 типу, апоптоз, мононуклеарні лейкоцити

ВСТУП

Цукровий діабет 1 типу (ЦД1) — полігенне, мультифакторне захворювання, при якому генетична схильність у поєднанні з тригерами навколишнього середовища запускає активацію специфічних аутоімунних процесів, що призводять до загибелі β-клітин [1]. Ключова роль в патогенезі аутоімунного ураження β-клітин підшлункової залози відіграє дисрегуляція імунітету і програмованої загибелі клітин. Апоптоз займає провідне місце в підтримці клітинного балансу у фізіологічних умовах. Він бере участь у видаленні надлишку клітин, особливо у нервовій та імунній системах. Порушення регуляції апоптозу лежить в основі аутоімунних захворювань, зокрема, при цукровому діабеті 1 типу [2]. З'ясування молекулярних механізмів генетичного контролю і модулювання апоптотичного процесу необхідно для розуміння патогенезу цього захворювання, що в майбутньому, можливо, створить передумови для пошуку нових високоактивних антидіабетичних препаратів.

Відомо близько 200 видів лікарських рослин, які володіють цукрознижуючою дією [3]. Нашу увагу привернула Galega officinalis L. (козлятник лікарський) [6-9] зважаючи на те, що її

продовжене використання сприяє регенерації β-клітин острівців Лангерганса [4].

Метою роботи було з'ясувати вплив БФ ЕКЛ на вміст проапоптичного білка p53 і антиапоптичного білка Bcl-2 у МНЛ периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

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», затвердженими І 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 («Sigma», США) з розрахунку 5,5 мг на 100 г маси тіла. Через два тижні після індукції діабету, тваринам per os вводили БФ ЕКЛ впродовж 14 діб (у дозі 0,6 г на 1 кг маси тіла тварини, в об'ємі 1 мл). У роботі використовували ЕГЛ, позбавлений алкалоїдів, які є високотоксичними речовинами. Отримання БФ ЕГЛ було проведено згідно з протоколом, який

описано нами раніше [5]. МНЛ виділяли з гепаринізованої крові шляхом центрифугування у градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho=1,119-1,077$ г·см⁻³) [10]. Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних білків Bcl-2 і p53 використовували непрямий імунопероксидазний метод [11]. 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.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Хронічна гіперглікемія є основним патогенетичним чинником при цукровому діабеті, що обумовлює утворення активних форм кисню, активацію iNOS, продукування NO з наступним утворенням пероксинітриду та високореактивних гідроксильних радикалів, які, у свою чергу, спричинюють інтенсивне пошкодження ДНК у клітинах-мішенях. Зростання вмісту проапоптичного білка p53 за умов ЦД, відбувається у відповідь на пошкодження ДНК, що індукується дією активних метаболітів кисню та нітрогену.

За умов ЕЦД показано підвищення вмісту білка p53 у МНЛ периферичної крові щурів, про що свідчить зростання кількості p53⁺⁺-клітин у 2,9 рази, порівняно з контролем (рис. 1).

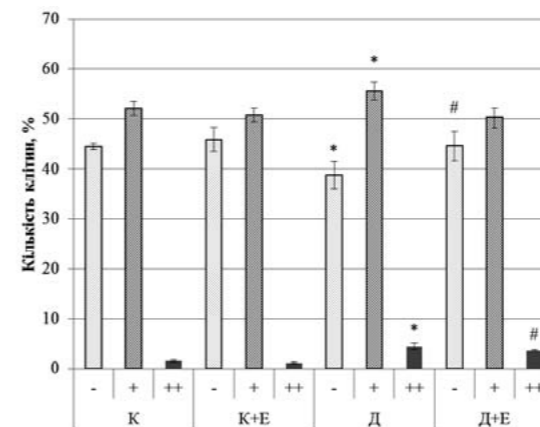


Рис. 1. Імуноцитохімічний аналіз вмісту білка p53 у МНЛ крові щурів у разі введення ЕКЛ контрольним тваринам та тваринам з ЕЦД.

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

Аналіз отриманих результатів показав зниження вмісту білка p53 у разі введення ЕКЛ здоровим тваринам (кількість p53⁺⁺-клітин зменшувалася в 1,4 рази) та тваринам з цукровим діабетом (кількість p53⁺⁺-клітин зменшувалася в 1,2 рази) (рис. 1). На фоні зростання вмі-

ту проапоптичного білка у МНЛ крові при ЕЦД встановлено зменшення кількості Bcl-2⁺ та Bcl-2⁺⁺ (в 4,9 та 5,2 рази відповідно) (рис. 2). Білок Bcl-2 підвищує виживання клітин, індукованих до апоптозу, взаємодіючи з Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1 — фактор, який активує апоптоз) і каспазою-9, і таким чином блокує передачу апоптичного сигналу [12, 13].

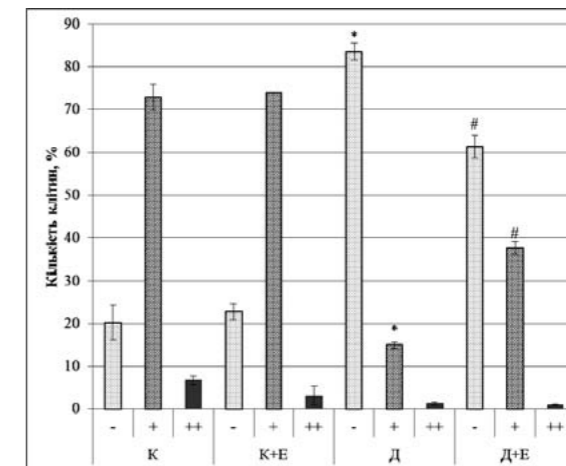


Рис. 2. Імуноцитохімічний аналіз вмісту білка Bcl-2 у МНЛ крові щурів у разі введення ЕКЛ контрольним тваринам та тваринам з ЕЦД.

Отримані нами результати вказують на підвищення вмісту антиапоптичного білка Bcl-2 у відповідь на введення БФ ЕКЛ тваринам з ЕЦД (кількість Bcl-2⁺ — клітин збільшується у 2,5 рази, порівняно з діабетом).

ВИСНОВКИ

Біологічна дія БФ ЕКЛ за умов цукрового діабету спрямована на нормалізацію співвідношення кількості лейкоцитів, які містять про- (p53) і антиапоптичний (Bcl-2) білки, що свідчить про пригнічуючий вплив досліджуваного екстракту на генетично запрограмовану загибель імунокомпетентних клітин крові. Численними дослідженнями показано захисний ефект антиоксидантів у процесі апоптозу [14]. Встановлений біологічний ефект БФ ЕКЛ ми пояснюємо дією біологічно активних речовин (флавоноїди, вітамін Е), які володіють антиоксидантними властивостями та екстрагуються за наших умов виділення.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України (проект № Ф54.4/017).

ЛІТЕРАТУРА

- DeFranco S. Defective function of the Fas apoptotic pathway in type 1 diabetes mellitus

- scorrelateswithageat onset / S. DeFranco, A. Chiochetti, M. Ferretti // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 20. — P. 567–576.
2. Cohen J. J. Apoptosis: physiologic cell death / J. J. Cohen, R. C. Duke, V. A. Fadok et al. // *J. Clin. Lab. Med.* — 1994. — Vol. 124. — P. 761–765.
 3. Буглак Н.И. Фитотерапия сахарного диабета / Н.И. Буглак // *Сімейна медицина.* — 2008. — № 1. — С. 65–68.
 4. Sendrail M. Experimental study of the action of plant drugs with a glycogenic effect on the cytological structure of the insular pancreas / M. Sendrail, D. Vincent, M. Sendrail-Pesque, M. Mahoux // *Sem. Hop.* — 1961. — Vol. 2, № 37. — P. 389–398.
 5. Хохла М. Р. Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської / М. Р. Хохла, Г. Я. Клевета, Я. П. Чайка та ін. // *Біол. студії / Studia Biologica.* — 2012. — № 6(1). — P. 37–46.
 6. Pundarikakshudu K. Anti-bacterial activity of *Galega officinalis* L (goat's rue) / K. Pundarikakshudu, J. K. Patel, M.S. Bodar, S.G. Deans // *J. Ethnopharmacol.* — 2001 — Vol. 77. — P. 111–112.
 7. Neef H. Inhibitory effects of *Galega officinalis* on glucose transport across monolayers of human intestinal epithelial cells / H. Neef, P. Augustijns, P. Declercq // *Pharmaceut. Pharmacol. Lett.* — 1996. — Vol. 6. — P. 86–89.
 8. Champavier Y. Acetylated and non-acetylated flavonoltriglycosides from *Galega officinalis* / Y. Champavier, D. P. Allais, A. J. Chulia, M. Kaouadji // *Chem. Pharm. Bull.* — 2000. — Vol. 48. — P. 281–282.
 9. Atanasov A. T. Anti-platelet fraction from *Galega officinalis* L. Inhibits platelet aggregation / A. T. Atanasov, B. Tchobanov // *J. Med. Food.* — 2002. — Vol. 5(4). — P. 229–234.
 10. Лаповець Л. Лабораторна імунологія / Л. Лаповець, Б. Луцик. — К.: Арал, 2004. — 173 с.
 11. Беркало Л. В. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва. — Полтава: Полімет, 2003. — 320 с.
 12. Hale A. J. Apoptosis: molecular regulation of death / A. J. Hale, C. A. Smith, L. C. Sutherland et al. // *Eur. J. Biochem.* — 1996. — Vol. 236. — P. 1–26.
 13. Brenner C. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator / C. Brenner, H. Cadiou, H. L. Vieira et al. // *Oncogene.* — 2000. — Vol. 19. — P. 329–336.
 14. Briehl M. M. Down regulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis / M. M. Briehl, I. A. Cotgreave, G. Powis // *Cell Death Differ.* — 1995. — Vol. 2. — P. 41–46.

УДК: 616.379-008.64:599.323.45.:591.111.1.633.881

М. И. Лупак, О. П. Каныка, Г. Я. Клевета, Я. П. Чайка, М. И. Скибицкая, Н. А. Сибирная

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ВЛИЯНИЕ БЕЗАЛКАЛОИДНОЙ ФРАКЦИИ ЭКСТРАКТА ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ P53 И BCL-2 В МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Имуноцитохимическим методом показано количественное перераспределение мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) периферической крови крыс содержащих проапоптотический белок p53 и антиапоптотический белок Bcl-2 в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭСД). Применение безалкалоидной фракции экстракта галеги лекарственной (БФ ЭГЛ) в условиях ЭСД нормализует соотношение МНЛ, содержащих вышеупомянутые белки-регуляторы апоптоза, что свидетельствует об угнетающем влиянии БФ ЭГЛ на запрограммированную гибель иммунокомпетентных клеток. Антиапоптотический эффект исследуемого экстракта можно объяснить антиоксидантным действием биологически активных веществ, входящих в его состав.

Ключевые слова: Галега лекарственная, сахарный диабет 1 типа, апоптоз, мононуклеарные лейкоциты

UDC: 616.379-008.64:599.323.45.:591.111.1.633.881

М. И. Лупак, О. П. Каныка, Г. Я. Клевета, Я. П. Чайка, М. И. Скибицкая, Н. О. Сибирная

Ivan Franko National University of Lviv

THE INFLUENCE OF ALKALOID-FREE FRACTION OF *GALEGA OFFICINALIS* EXTRACT ON THE p 53 AND Bcl — 2 PROTEINS CONTENT OF RATS MONONUCLEAR LEUKOCYTES UNDER THE EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 1

Using immunohistochemistry method we saw quantitative redistribution of mononuclear leukocytes (MNL) of rat's peripheral blood. MNL contain proapoptotic protein p53 and antyapoptotic protein Bcl-2 under conditions of experimental diabetes mellitus (EDM) type 1. Application of alkaloid-free fraction extract of *Galega officinalis* (AFF EGO) under EDM normalizes the ratio of mononuclear leukocytes which contain the aforementioned protein-regulators of apoptosis. This indicates that the inhibitory effect of AFF EGO on programmed death of immunocompetent cells. The investigated anti-apoptotic effect of the studied extract can be attributed to antioxidant action of bioactive substances in its composition.

Key words: *Galega officinalis*, diabetes mellitus type 1, apoptosis, mononuclear leukocytes.

Адреса для листування:

79005, м. Львів, майдан вул. Грушевського, 4

Надійшла до редакції:

7.06.2013 р.