

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

БІЛА Іванна Іванівна

УДК 576.321.36

ВПЛИВ АГМАТИНУ НА АГРЕГАЦІЙНУ ТА МІГРАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ
ЛЕЙКОЦИТІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
СИБІРНА Наталія Олександрівна,
Львівський національний університет імені Івана Франка,
завідувач кафедри біохімії.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
УШАКОВА Галина Олександрівна,
Дніпровський національний університет імені
Олеся Гончара,
завідувач кафедри біофізики та біохімії;

доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник **ІСКРА Руслана Ярославівна**,
Інститут біології тварин НААН України,
заступник директора із наукової роботи

Захист відбудеться “ 4 ” жовтня 2019 р. о 13:30 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка, ауд. 333.

Поштова адреса: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, Львівський національний університет імені Івана Франка.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий “ 30 ” серпня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14
кандидат біологічних наук, доцент

М. В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Цукровий діабет (ЦД) – хвороба, для якої характерна наявність метаболічних порушень багатофакторної етіології [Tiru H. N. et al., 2011]. Клінічні та експериментальні дослідження крові людей хворих на ЦД та тварин із стрептозотоциніндукованим діабетом демонструють значні порушення морфофункціонального стану імункомпетентних клітин крові, зокрема дисфункції адгезивної, агрегаційної та міграційної здатності лейкоцитів. [Menart-Houtermans B. et al., 2015; Tiru H. N. et al., 2011].

В свою чергу, морфофункціональний стан лейкоцитів узалежнений від комплексної взаємодії між білками мембрани, цитоскелетом і мережею внутрішньоклітинного сигналювання. Взаємодія мембрана–цитоскелет є важливою для підтримання динамічної сферичної форми клітини і ремоделювання “архітектури сигналювання” в клітинах імунної системи. У разі поляризації клітини ця динамічна взаємодія забезпечує зміну морфології і функції клітини та правильний напрям руху під час міграції лейкоцитів [Marelli-Berg F. M. et al., 2018; Fais S. et al., 2003]. Реорганізація актинового цитоскелету в результаті полімеризації-деполімеризації актину має важливе значення для здійснення локомоторних функцій лейкоцитів і є ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності імункомпетентних клітин.

Однією з причин зміни динаміки процесу полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах крові за умов ЦД є розвиток оксидативно-нітративного стресу. В умовах стресу надмірне окиснення протеїнів призводить до руйнування F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів [Brodyak I. et al., 2014; Lee C.-L. et al., 2005; Wilson C. et al., 2015]. Надпродукція активних форм кисню та нітрогену збільшує ймовірність окиснення тіолових груп мономерів тубуліну, а також сприяє утворенню дисульфідних зв'язків між α - і β -тубуліном, зменшуючи здатність мікротрубочок до полімеризації та порушуючи структуру актину [Landino L. M. et al., 2007]. У молекулах F-актину мішенями дії окиснювальних молекул є залишки Cys374 і Met44, окиснення яких призводить до деполімеризації актинових філаментів [Kanga Y. Et al., 2016]. Як показано у дослідженнях кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка, розвиток оксидативно-нітративного стресу в клітинах периферичної крові за умов ЦД може попередити агматин (4-амінобутил-гуанідин) – продукт декарбоксілювання L-аргініну [Ferents I. et al., 2012; Ferents I. et al., 2016].

Агматин в організмі діє як нейротрансмітер і нейромодулятор, є ендogenousним лігандом для імідазолінових рецепторів (I_1/I_2) і, з меншою афінністю, для α_2 -адренорецепторів, N-метил-D-аспартат і серотонінових рецепторів. Одним із біологічних ефектів агматину в організмі, що реалізується рецептор-опосередкованим шляхом, є здатність впливати на метаболізм глюкози за умов її підвищеної концентрації [Raasch W. et al., 2001; Naoki Akasaka et al., 2019]. Дослідження механізмів впливу агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів крові при ЦД є пріоритетними та актуальними, а отримані результати можуть сприяти розробці нових підходів у створенні препаратів з гіпоглікемічною, антиоксидантною та імуномодулюючою дією.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за темами: “Механізми корекції метаболічних порушень клітин системи крові за умов цукрового діабету 1-го типу” (номер держреєстрації 0113U003046), термін виконання 2013–2015 роки та “Біохімічні механізми розвитку, діагностики та корекції діабетіндукованого оксидативно-нітративного стресу” (номер держреєстрації 0117U001225), термін виконання 2017–2019 роки.

Мета та завдання досліджень. Метою даної роботи було дослідження впливу агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету, шляхом визначення змін показників оксидативного стресу та процесів полімеризації-деполімеризації актинових філаментів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

1. Визначити вміст кінцевих продуктів глікації (AGEs) у лейкоцитах та плазмі периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення агматину.

2. З'ясувати вплив агматину на стан показників оксидативного стресу у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД, шляхом визначення: вмісту ТБК-позитивних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ); вмісту кінцевих продуктів оксидації білків (AOPPs); активності ферментів системи антиоксидантного захисту.

3. Шляхом дослідження WGA-індукованої агрегації клітин, оцінити як впливає агматин на функціональний стан лейкоцитів крові щурів у нормі та за умов ЕЦД.

4. Дослідити процеси полімеризації-деполімеризації актину у лейкоцитах щурів для оцінки міграційної здатності імунокомпетентних клітин крові у всіх досліджуваних групах.

5. З'ясувати вплив агматину на трансдукцію лектиніндукованих сигналів, які передаються через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів щурів і викликають реорганізацію структурних елементів цитоскелету цих клітин у нормі та за умов ЕЦД.

Об'єкт дослідження: агрегаційна та міграційна здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину.

Предмет дослідження: оксидативно-нітративний та карбонільний стреси, процеси полімеризації актину, ферменти системи антиоксидантного захисту лейкоцитів, продукти перекисного окиснення ліпідів, агрегація лейкоцитів.

Методи дослідження: біохімічні (визначення активності ензимів, вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, вмісту відновленого глутатіону, кінцевих продуктів глікації та оксидації білків), молекулярно-біологічні (флюоресцентно-мікроскопічне дослідження процесу полімеризації актину, вестерн-блот аналіз), цитологічні (світлова мікроскопія), статистичні (метод варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента).

Наукова новизна одержаних результатів. З'ясовано вплив агматину на окремі показники оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах периферичної

крові щурів за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів. За умов діабету на фоні введення досліджуваного поліаміну спостерігали підвищення активності ензимів системи антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та зниження рівня продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів порівняно з діабетичною групою тварин. Отримані результати вказують на відновлення редокс-гомеостазу та балансу ензиматичної ланки антиоксидантного захисту в лейкоцитах крові тварин за змодельованої патології на фоні введення агматину. Встановлено, що вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах за ЕЦД є достовірно вищим порівняно з контрольною групою тварин, що вказує на зміну структурно-функціональних властивостей і преактивований стан цих клітин у разі діабету. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні зниження загального рівня актину зменшується кількість довгих актинових філаментів цитоскелету, проте зростає вміст коротких актинових філаментів. Отримані результати вказують на те, що хоч вихідний вміст полімеризованого актину в лейкоцитах у разі ЕЦД знижується, проте процес полімеризації актину інтенсифікується. Введення агматину тваринам, хворим на діабет, виявляє коригуючий вплив на полімеризацію актину в лейкоцитах.

З'ясовано вплив досліджуваного поліаміну на агрегаційну здатність лейкоцитів, індуковану лектином зародків пшениці (WGA) у нормі та за умов діабету. Вперше досліджено вплив агматину на перерозподіл фракцій актину, які представлені щільно асоційованими з мембраною філаментами цитоскелету, короткими актиновими філаментами цитоскелету і мономерами актину в лейкоцитах, після їхньої преінкубації впродовж тридцяти секунд, однієї та трьох хвилин із сіалоспецифічним лектином WGA у контрольній групі тварин та за умов ЕЦД. Зміни на рівні реорганізації актинового цитоскелету, у результаті полімеризації-деполімеризації актину, зумовлені порушенням трансдукції лектиніндукованого сигналу через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів, кількість та структура яких за умов ЕЦД є зміненою.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані експериментальні дані свідчать про коригуючий вплив агматину як речовини, якій притаманна гіпоглікемічна дія, на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів, зокрема на процеси полімеризації актину, стан системи антиоксидантного захисту, процеси ПОЛ за умов ЕЦД та вказують на доцільність його застосування в комплексній терапії ЦД та корекції ускладнень, що виникають за досліджуваної патології. Отримані у дисертаційній роботі дані будуть упроваджені у навчальний процес під час викладання спецкурсів “Біохімія крові” та “Функціональна біохімія”, які читаються на кафедрі біохімії біологічного факультету ЛНУ імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом спільно з науковим керівником д. б. н., професором Сибірною Н. О. розроблено план дослідження, проведено інтерпретацію та узагальнення результатів, підготовлено публікації до друку. Пошук та аналіз наукової літератури згідно теми кандидатської дисертації, введення тваринам агматину, основний обсяг експериментальної роботи, статистичне опрацювання результатів та написання дисертаційної роботи виконано безпосередньо здобувачем. За всебічну допомогу та корисні поради здобувач висловлює щиру подяку к. б. н., доц. Бродяк І. В.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на X, XI, XIV, XV міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014, 2015, 2018, 2019); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); 4-ому з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, 2014); 7-ій міжнародній Вейгелівській конференції (Львів, 2017), 4-ому щорічному регіональному симпозиумі з питань охорони здоров'я (Київ, 2019), а також на наукових семінарах кафедри біохімії біологічного факультету та на щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, одна з них – у закордонному виданні та 10 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах, конгресах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки» та «Список використаних джерел» та «Додаток 1». Дисертацію викладено на 147 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 22 рисунками та 2 таблицями. Список літератури включає 230 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури проаналізовано сучасні дані щодо механізмів розвитку, патогенезу та ускладнення цукрового діабету 1-го типу. Описані порушення функціонального стану лейкоцитів за умов даної хвороби. Представлено відомості стосовно міграційної здатності імунокomпетентних клітин крові. Значну увагу приділено розгляду процесів реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів. Окремий розділ огляду літератури присвячений агматину, як речовині, що володіє гіпоглікемічними властивостями.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях масою 150–180 г (кількість тварин (n) зазначено в описі результатів досліджень). Тварини були поділені на 4 групи: перша – контроль (К); друга – контрольні тварини, яким вводили агматин (К + Агм); третя – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД); четверта – тварини з ЕЦД, яким вводили агматин (ЕЦД + Агм). Починаючи з 3-го дня від моменту індукції діабету тваринам внутрішньом'язово вводили агматин ("Sigma", США) у концентрації 20 мг/кг протягом 14 днів. Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 15-й день експерименту. Загальну фракцію лейкоцитів виділяли у градієнті густини фікол-тріомбрас (ρ = 1,076–1,078) [Boyum A. et al., 1968].

Екстракцію протеїнів для визначення вмісту полімеризованого актину з клітин проводили за допомогою буферу лізису RIPA (2,5 млн лейкоцитів розсуспендовували у 100 мкл буферу). Фракціонування актину в лізатах лейкоцитів здійснювали за методикою [Kwiatkowska K. et al., 1999; Kwiatkowska K. et al., 2003]. Визначення вмісту полімеризованого актину у лейкоцитах методом вестерн-блотингу здійснювали згідно зі стандартним протоколом [Towbin H. et al., 1992].

Для детекції сигналу застосовували набір реактивів для посиленої хемілюмінесценції (Millipore, США).

Агрегацію лейкоцитів визначали стандартним турбідометричним методом з використанням лазерного аналізатора агрегації “230 LA Биола” (“НПФ Биола”, Росія) [Воскобой И. В., 2002].

Активність СОД визначали згідно з методикою [Чевари С. и др., 1991], каталазну активність – [Королюк М. А. и др., 1988], активність ГПО – [Моин В. М., 1986] та активність ГР – [Goldberg D. M. et al., 1983]. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів проводили за методикою, описаною в [Тимирбулатов Р. А. и Селезнев Е. И., 1981], вмісту відновленого глутатіону – [Сибірна Н. О. та ін., 2006], вмісту кінцевих продуктів оксидатії (AOPPs) – [Kalousova et al., 2001], вмісту кінцевих продуктів глікації (AGEs) – [Nakayama K. et al., 1993].

Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$), знайдену після обчислення t за таблицею t -розподілу Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів глікації (advanced glycation end products, AGEs) у лейкоцитах та плазмі периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД. Важливими біомаркерами ЦД, які пов'язані із функціональним станом білків, є вміст кінцевих продуктів глікації в лейкоцитах периферичної крові. AGEs утворюються шляхом неензиматичної взаємодії редукуючих цукрів або окиснених ліпідів і білків, амінофосфоліпідів або нуклеїнових кислот [Gradinaru D. et al., 2013].

За умов діабету вміст AGEs у лейкоцитах зменшувався на 22 %, а у плазмі – збільшувався на 32 %, порівняно з контрольною групою, що є наслідком пригнічення функції транспортера глюкози GLUT 3 за умов гіпоінсулінемії. Введення агматину здоровим тваринам не спричиняло достовірних змін вмісту AGEs. Після введення агматину тваринам з діабетом спостерігали зниження цього показника в плазмі в 1,8 раза та достовірне збільшення вмісту продуктів глікації у лейкоцитах, майже до контрольних значень (рис. 1).

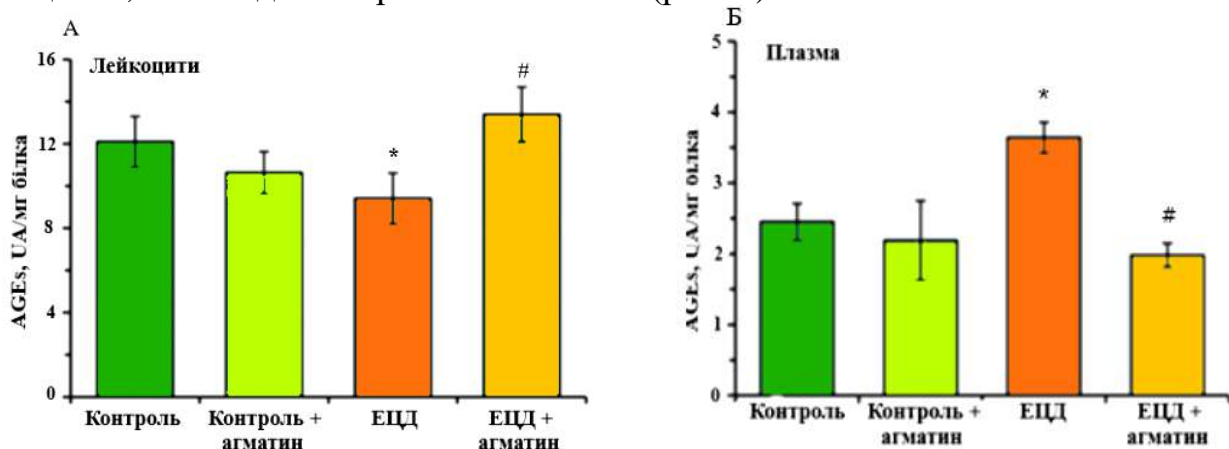


Рис. 1. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів глікації (AGEs) у лізатах лейкоцитів (А) та плазмі крові (Б) щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ($M \pm m$, $n = 5-6$). Примітка тут і далі * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$.

Відомо, що активація агматином I₂-імідазолінових рецепторів в мозковій речовині надниркових залоз підвищує секрецію β-ендорфінів, що призводить до активації μ-опіоїдних рецепторів в імунних клітинах (лімфоцитах, нейтрофілах і моноцитах), які, в свою чергу, активують мітоген-активовані протеїнкінази і фосфоліпаза С-опосередковане сигналювання, що призводить до вбудовування транспортерів глюкози в мембрану лейкоцитів [Ninković J. et al., 2013; Vrhovak et al., 2014]. Таким чином, внаслідок зниження концентрації глюкози у плазмі крові зменшується вміст AGEs, проте збільшується їхній вміст у лейкоцитах.

Дослідження впливу агматину на зміну показників оксидативного стресу у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД. Гідропероксиди, що утворилися внаслідок дії АФО на ліпіди, мають токсичний вплив на клітини як безпосередньо, так і через деградацію цих сполук до високотоксичних гідроксильних радикалів. Підвищення рівня перекисного окислення ліпідів корелює з високим вмістом глюкози в крові та інтенсифікацією оксидативного стресу за ЦД [Varashree B. S. et al., 2011].

За умов діабету відбувалось зростання кількості ТБК-позитивних продуктів в 1,4 раза, порівняно з контролем. У лейкоцитах контрольної групи тварин, яким вводили агматин достовірних змін не спостерігали. Введення агматину щурам з ЕЦД спричиняло нормалізацію досліджуваного показника майже до контрольних значень, а саме зменшення на 20 % порівняно з ЕЦД (рис. 2).

Накопичення продуктів вільно-радикального окиснення призводить до змін фізико-хімічних характеристик мембран лейкоцитів, що спричиняє зміну функціональних властивостей цих клітин крові. Результати проведених досліджень свідчать, що дія досліджуваного поліаміну спрямована на зниження інтенсивності утворення продуктів ПОЛ.

За умов діабету, вміст АОРРs у плазмі підвищувався в 1,6 раза порівняно з контролем, а у лейкоцитах достовірних змін не відбувалось (рис. 2).

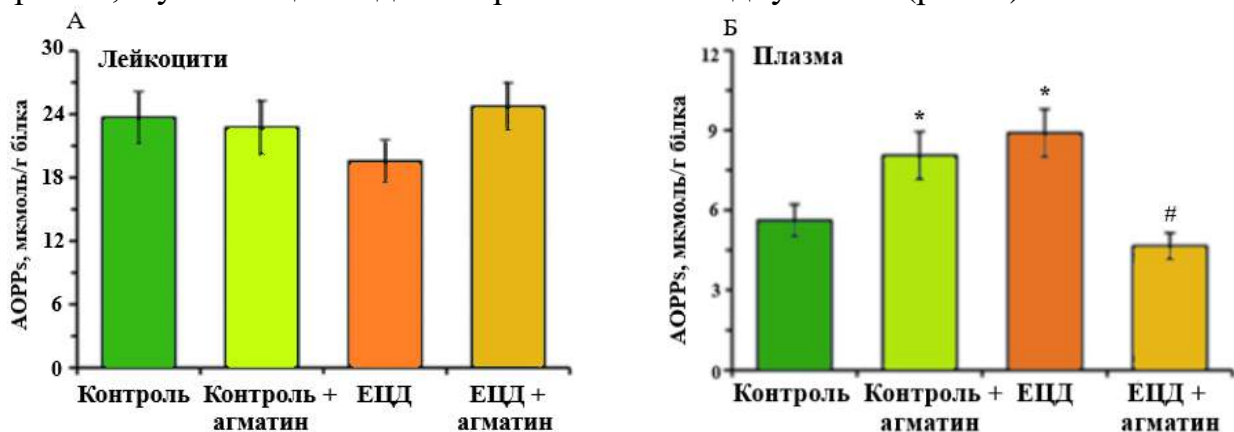


Рис. 2. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів оксидації (АОРРs) у лізатах лейкоцитів (А) та плазмі крові (Б) щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ($M \pm m$, $n = 5-6$).

Після введення агматину здоровим щурам рівень АОРРs у плазмі значно зріс порівняно з контрольною групою. У лейкоцитах вміст досліджуваного показника, після введення даного поліаміну не змінився, порівняно з контролем. Після введення агматину тваринам з ЦД, спостерігали незначне підвищення вмісту кінцевих продуктів оксидації у лейкоцитах, порівняно з діабетом, та достовірне зменшення

їхньої кількості у плазмі. Зниження рівня АОРРс у плазмі крові може бути пов'язано з гіпоглікемічною дією агматину в організмі піддослідних тварин [Ференц І. та ін., 2016].

У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що активність ензимів антиоксидантної системи достовірно знижується у лейкоцитах крові щурів за умов ЕЦД (рис. 3–4). Введення агматину контрольній групі щурів не спричинило достовірних змін в активності ферментів антиоксидантного захисту.

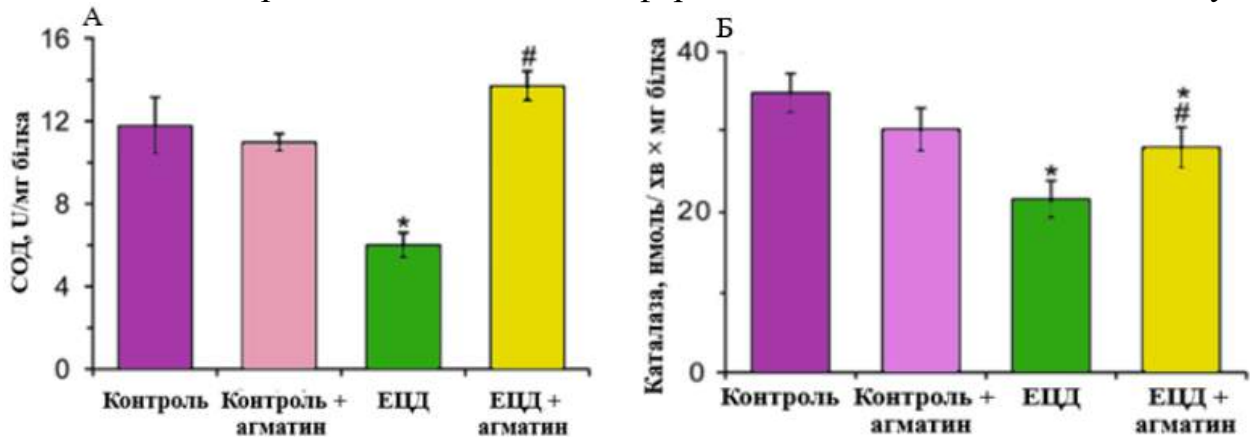


Рис. 3. Вплив агматину на активність СОД (А) та каталази (Б) у лейкоцитах крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ($M \pm m$, $n = 5-6$).

Після введення агматину тваринам з ЕЦД спостерігали підвищення активності СОД і каталази порівняно з діабетичною групою у 2,4 та 1,4 раза, відповідно. Зростання активності ферментів антиоксидантної системи у лейкоцитах крові діабетичних тварин після введення агматину можна розглядати як результат зниження неензиматичного глікозилювання білків, внаслідок прояву гіпоглікемічних властивостей досліджуваного поліаміну [Ференц І. та ін., 2012].

Зниження рівня GSH у лейкоцитах крові щурів з ЕЦД на 27 % порівняно з контролем, (рис. 4, Б) може бути показником довготривалих ускладнень діабету [Rahigude A. et al., 2012; Calabrese V. et al., 2012]. Активність ензиму ГР за умов ЕЦД знижувалась в 1,3 раза порівняно з її активністю в лейкоцитах здорових щурів.

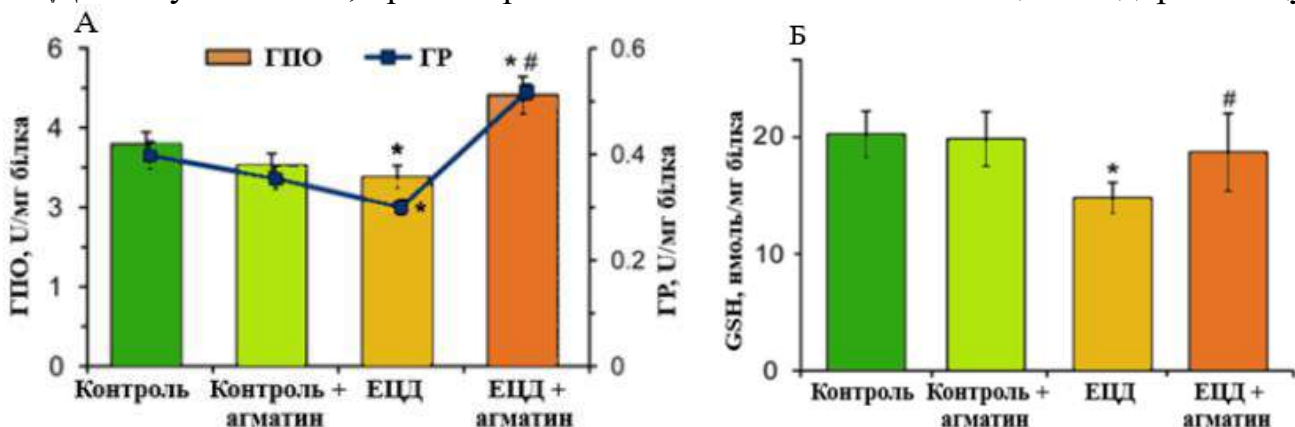


Рис 4. Активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази (А) та вміст відновленого глутатіону (Б) в лейкоцитах крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину ($M \pm m$, $n = 5-6$).

Нами виявлено, що введення агматину тваринам з ЕЦД обумовлювало зростання активності ГПО на 43 %, ГР – на 72 % (рис. 4, А). Зростання рівня GSH за

умов введення агматину може бути зумовлене підвищенням активності ГР, яка каталізує реакцію відновлення глутатіону.

Таким чином, агматин сприяє відновленню порушених функцій ферментів антиоксидантної системи лейкоцитів крові тварин за умов ЕЦД.

Визначення впливу агматину на функціональний стан лейкоцитів крові щурів у нормі та за умов ЕЦД шляхом дослідження WGA-індукованої агрегації клітин. За умов ЦД у разі використання як індуктора агрегації лектину WGA ступінь і швидкість агрегації лейкоцитів зростали в 2,0 рази та у 2,4 рази, відповідно, порівняно зі значеннями у контрольній групі (таблиця 1). Це може бути наслідком того, що у структурі глікопротеїнових рецепторів мембрани лейкоцитів тварин хворих на ЦД 1-го типу наявні (у підвищеній кількості порівняно зі здоровими тваринами) вуглеводні детермінанти, які у своїй структурі містять переважно N-ацетил- β ,D-глюкозамінові і N-ацетилнейрамінові фрагменти [Sybirna N. et al., 2015].

Таблиця 1

Показники WGA-індукованої агрегації лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЦД), а також на фоні введення агматину ($M \pm m$; $n=5-6$)

Показники	Контроль	Контроль + агматин	ЕЦД	ЕЦД + агматин
Розмір агрегату, ум. од.	$4,1 \pm 0,5$	$12,9 \pm 1,5^*$	$8,7 \pm 0,9^*$	$24,0 \pm 2,6^{\#}$
Ступінь агрегації, %	$21,8 \pm 2,5$	$49,5 \pm 4,5^*$	$43,0 \pm 3,7^*$	$60,2 \pm 4,9^{\#}$
Швидкість агрегації, %/хв	$4,3 \pm 0,75$	$29,7 \pm 3,1^*$	$10,5 \pm 1,9^*$	$34,3 \pm 2,9^{\#}$

Введення агматину контрольним тваринам і тваринам з ЦД спричиняло зростання розміру агрегату, швидкості та ступеня WGA-індукованої агрегації лейкоцитів порівняно з відповідними групами тварин без введення цього поліаміну (таблиця 1).

З урахуванням збільшення вмісту термінальних сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран лейкоцитів у тварин з ЕЦД на фоні введення агматину [Ференц І. В. та інші., 2013] отримані результати WGA-індукованої агрегації можна пояснити збільшення кількості саме α -2,6-зв'язаних сіалових кислот у структурі олігосахаридних детермінант глікопротеїнів лейкоцитів тварин після введення даного поліаміну, оскільки сіалові кислоти, які приєднані (α 2 \rightarrow 3)-глікозидним зв'язком до субтермінальних цукрів у структурі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів набагато швидше піддаються гідролітичному відщепленню за участю сіалідаз, ніж (α 2 \rightarrow 6)-зв'язані залишки цих цукрів [Ференц І. В. та інші., 2013; Sybirna N. et al., 2015].

Дослідження процесів полімеризації-деполімеризації актину у лейкоцитах щурів для оцінки міграційної здатності імунокомпетентних клітин крові у всіх досліджуваних групах. За рівнем флюоресценції Phalloidin-Alexa Fluor 350, який зв'язує F-актин у співвідношенні 1:1, не зв'язуючи при цьому G-актин [Carulli et al., 2006], ми оцінили вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов ЕЦД та на фоні введення агматину.

Аналізуючи результати проведених досліджень, було встановлено, що вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові за ЕЦД був достовірно вищим порівняно з контрольною групою тварин, що вказує на преактивованій стан і зміну структурно-функціональних властивостей цих клітин у разі діабету.

За умов ЕЦД на фоні введення агматину вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах щурів достовірно знижувався порівняно з клітинами у разі діабету. Вміст F-актину становив $1,1 \pm 0,07$ і $4,05 \pm 1,12$ у.о., відповідно. Низькі значення показника вмісту полімеризованого актину у тварин із ЕЦД на фоні введення даного поліаміну можуть бути обумовлені зняттям стану преактивованості лейкоцитів та відновленням процесів полімеризації-деполімеризації актинових філаментів [Advani A. et al., 2004].

Для з'ясування молекулярних механізмів процесів кількісного перерозподілу фракцій актинових філаментів, які опосередковують зміни функціонального стану лейкоцитів, було проведено дослідження реорганізації актинового цитоскелету за умов ЕЦД та на фоні введення агматину методом імуноблот-аналізу.

У разі ЕЦД загальний вміст актину в лейкоцитах периферичної крові знижувався на 24 %. Введення агматину хворим тваринам призводило до зростання вмісту актину на 46 % порівняно з ЕЦД, у здорових тварин цей показник після дії агматину знижувався порівняно з контролем (рис. 5).

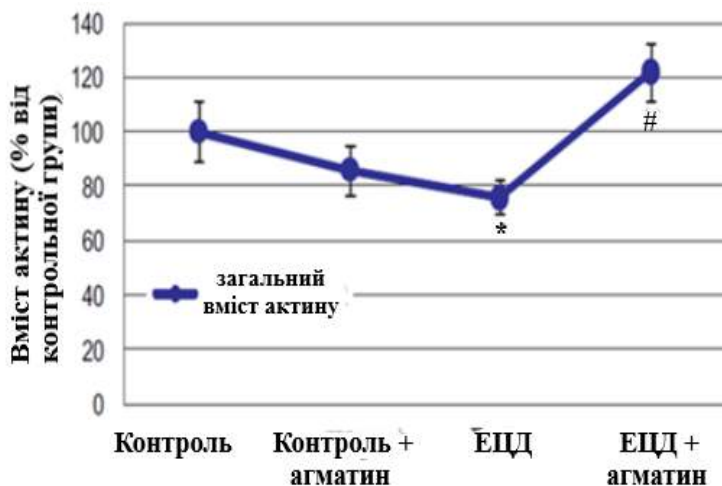


Рис. 5. Вміст загального актину (сума філаментів цитоскелету, коротким філаментів актину та мономерів актину) в лейкоцитах щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину (методом імуноблот-аналізу) ($M \pm m$, $n = 5-6$).

Було проведено порівняльний аналіз кількісного перерозподілу фракцій актину, (рис. 6) представлених філаментами цитоскелету, короткими актиновими філаментами і мономерами актину. У клітинах контрольної групи тварин полімеризований актин домінує щодо мономерів актину у співвідношенні 8 : 2. В лейкоцитах тварин з ЕЦД вміст полімеризованого актину щодо мономерів актину співвідноситься як 9 : 1. Звертає на себе увагу зменшення вмісту фракцій філаментів

цитоскелету із одночасним зростанням фракції коротких актинових філаментів, що вказує на преактивований стан клітин.

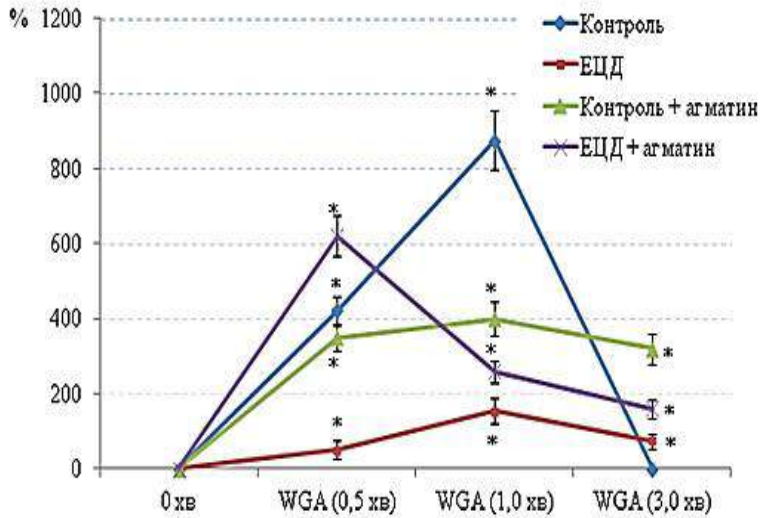


Рис. 6. Динаміка кількісного перерозподілу вмісту фракцій актину у лізатах лейкоцитів, представлених довгими актиновими філаментами цитоскелету, короткими актиновими філаментами і мономерами актину, у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину. Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів. Вміст актину виражений у відсотках від сумарного вмісту актину кожної окремої фракції ($M \pm m$, $n = 5-6$).

Після введення агматину контрольній групі щурів та тваринам з ЕЦД полімеризований актин домінує щодо мономерів актину у співвідношенні 9 : 1, та 8,5 : 1,5, відповідно. Такі результати вказують на те, що після ін'єкцій агматину відбувається перехід лейкоцитів із стану преактивованості у динамічну сферичну форму, підтримання та стабілізація якої реалізується завдяки актиновим філаментам цитоскелету [Algeciras-Schimnich A. et al. 2002; Fais S. et al., 2003].

Вплив агматину на трансдукцію лектиніндукованих сигналів, які передаються через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів щурів і викликають реорганізацію структурних елементів цитоскелету лейкоцитів. З метою з'ясування змін у системі адгезивних взаємодій типу клітина-матрикс чи клітина-клітина, ми проводили преінкубацію лейкоцитів із лектином WGA. У проведенні WGA-стимульовального сигналу в лейкоцити задіяні рецептори, які у термінальній позиції олігосахаридних ланцюгів поверхневих глікокон'югатів містять сіалові кислоти. Тому наступним нашим завданням було дослідити вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах контрольних тварин і за умов ЦД.

У контрольній групі тварин динаміка стимуляції лектином WGA вказує на чітко виражений пік полімеризації актину на 1 хв інкубації з лектином і його деполімеризацію на 3 хв (рис. 7).

У тварин з ЕЦД стимульовальний ефект лектину WGA теж приводив до формування піку полімеризації актину на 1 хв, проте вміст F-актину був в 5,5 разів нижчим порівняно з контрольною групою тварин (рис. 7). Низький рівень полімеризації актину у разі преінкубації лейкоцитів із сіалоспецифічним лектином WGA можна пояснити як вихідним станом преактивованості лейкоцитів за діабету, так і змінами структури та кількості сіаловмісних гліканів на поверхні мембран лейкоцитів.

На фоні введення агматину здоровим тваринам динаміка полімеризації актину вказує на формування піку полімеризації F-актину на 1-у хв стимулювання

лектином WGA. Високі значення вмісту F-актину на 3-ій хв після дії лектину WGA (рис. 7) свідчать про порушення процесу деполімеризації актину.

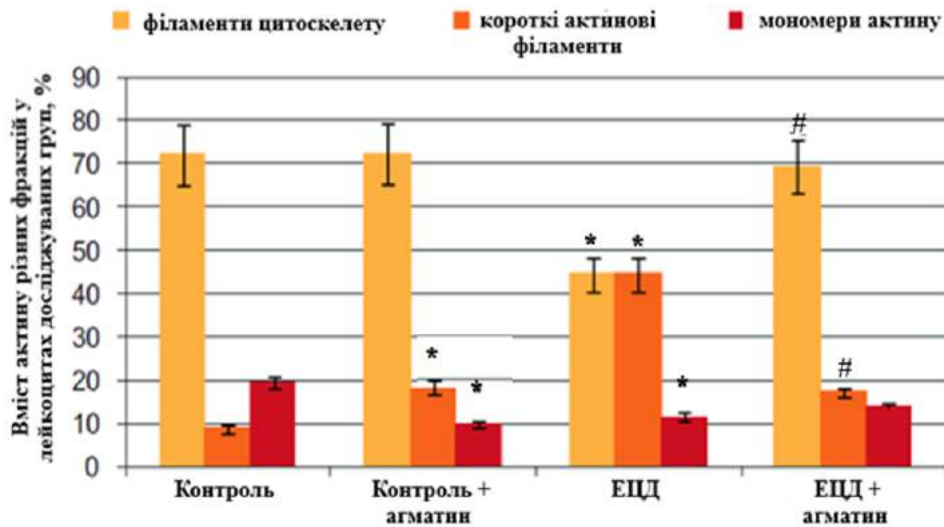


Рис. 7. Динаміка полімеризації актину в лейкоцитах після фіксування, пермеабілізування й інкубування лейкоцитів з Phalloidin Alexa Fluor 350 у стані спокою (0 хв) і у стані активації (після преінкубації із сіалоспецифічним лектином WGA впродовж 0,5, 1 і 3-х хв) контрольних тварин і щурів з ЕЦД. Збільшення у 1000 разів. Часові точки вказують відсоток F-актину відносно його вмісту в лейкоцитах у стані спокою, який прийнято за 0 %.

Такі зміни зумовлені порушенням трансдукції сигналу у результаті зменшення кількості сіалоглікокон'югатів, які у термінальній позиції містять залишки сіалових кислот, зв'язані $\alpha 2,3$ -глікозидними зв'язками.

На відміну від цього, в діабетичній групі на фоні введення агматину формування піку полімеризації актину відбувалось вже на 0,5 хв стимулювання лектином WGA і спостерігався дуже стрімкий процес деполімеризації на 1 хв після дії лектину, а це вказує на те, що основний вклад у процес трансдукції сигналу зумовлений олігосахаридними ланцюгами глікокон'югатів, які у термінальній позиції містять саме $\alpha 2,3$ -зв'язані залишки сіалових кислот [Ferents I. et al., 2013].

На основі результатів денситометричного аналізу імуноблотів з використанням анти-актинових антитіл, проведено порівняльний аналіз перерозподілу фракцій актину, представлених: філаментами цитоскелету, короткими актиновими філаментами і мономерами актину (рис. 8, А–Г). Отримані дані вказують на те, що у контрольній групі тварин процес полімеризації актину за умов активації лейкоцитів лектином WGA впродовж 0,5 хв інтенсифікується у фракції коротких актинових філаментів, а на 1 хв – у філаментах цитоскелету (рис. 8, А).

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на 1 і 3 хв після дії лектину WGA рівень F-актину фракції філаментів цитоскелету не зазнавав достовірних змін, проте відбувалося посилення процесу деполімеризації актину, представленого короткими філаментами, внаслідок чого збільшувався вміст мономерів актину до 30 % на 3 хв впливу лектину WGA (рис. 8, В). Динаміка перерозподілу вмісту актину у контрольній групі тварин на фоні введення агматину свідчить, що основні зміни в активованих лейкоцитах відбуваються у філаментах цитоскелету, корелюючи зі зміною вмісту мономерів актину (рис. 8, Б).

У разі введення агматину тваринам з ЕЦД процес полімеризації актину в лейкоцитах інтенсифікується у фракції філаментів цитоскелету та відбувається деполімеризація коротких актинових філаментів порівняно з тваринами із ЕЦД без введення агматину. За умов ЕЦД на фоні введення агматину стимулювальний ефект лектину WGA впродовж 0,5 хв приводить до інтенсифікування процесу полімеризації актину у фракції філаментів цитоскелету лейкоцитів внаслідок деполімеризації актину коротких філаментів і використання мономерів актину (рис. 8, Г).

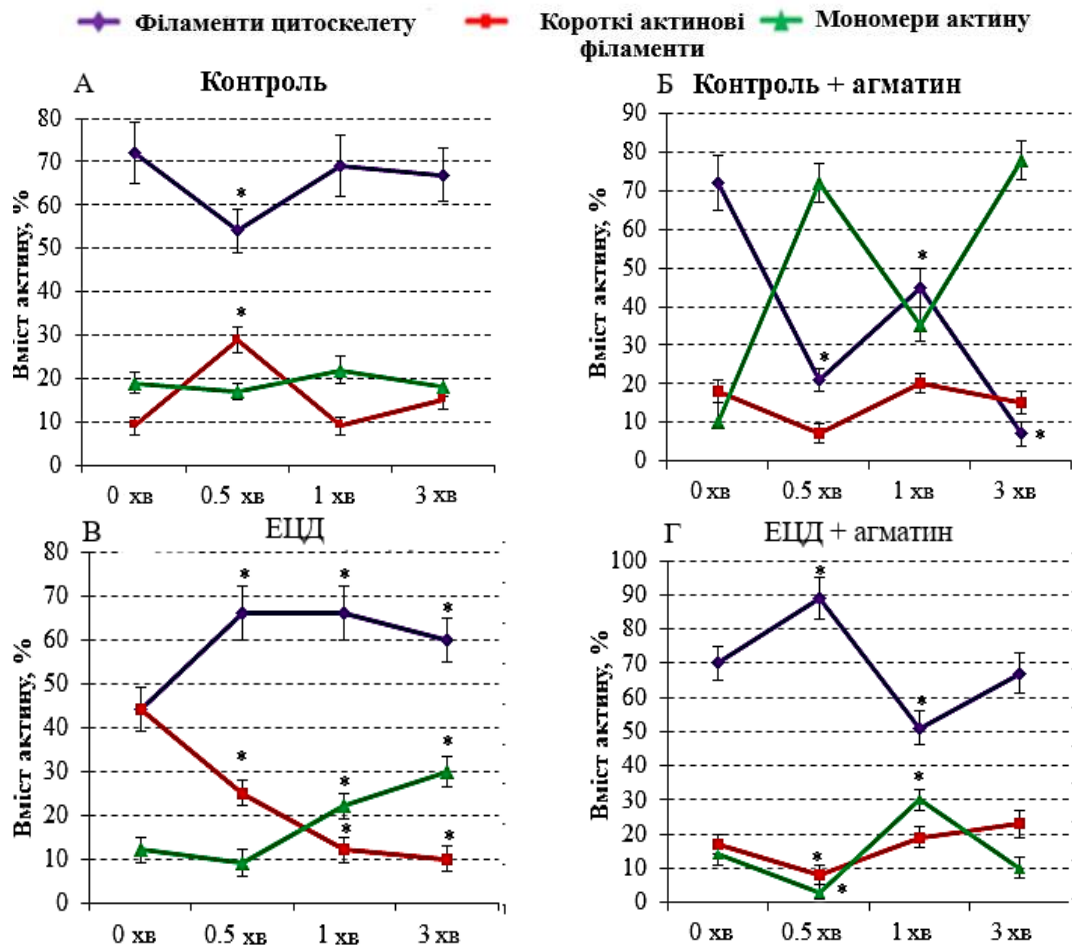


Рис. 8. Динаміка перерозподілу вмісту фракцій актину у лізатах лейкоцитів, що містили довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі актинові філаменти та мономер актину, у стані спокою (0 хв) і у стані активації (після преінкубації із лектином WGA впродовж 30 секунд, 1 і 3 хвилин) цих клітин крові: А – контроль; Б – контроль на фоні введення агматину; В – експериментальний цукровий діабет (ЕЦД); Г – експериментальний цукровий діабет на фоні введення агматину. Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів. Вміст актину виражений у відсотках від сумарного вмісту актину кожної окремої фракції.

Отже, за умов гіперглікемії надмірне утворення радикала супероксид-аніона ($O_2^{\cdot-}$) у результаті аутоокиснення глюкози, неензиматичного глікозилювання білків, інтенсифікації електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, підвищення активності ксантиноксидази, НАДФН-оксидази та інших метаболічних процесів і надпродукція оксиду азоту іNO-синтазою призводять до розвитку оксидативно-нітративного стресу (рис. 9).

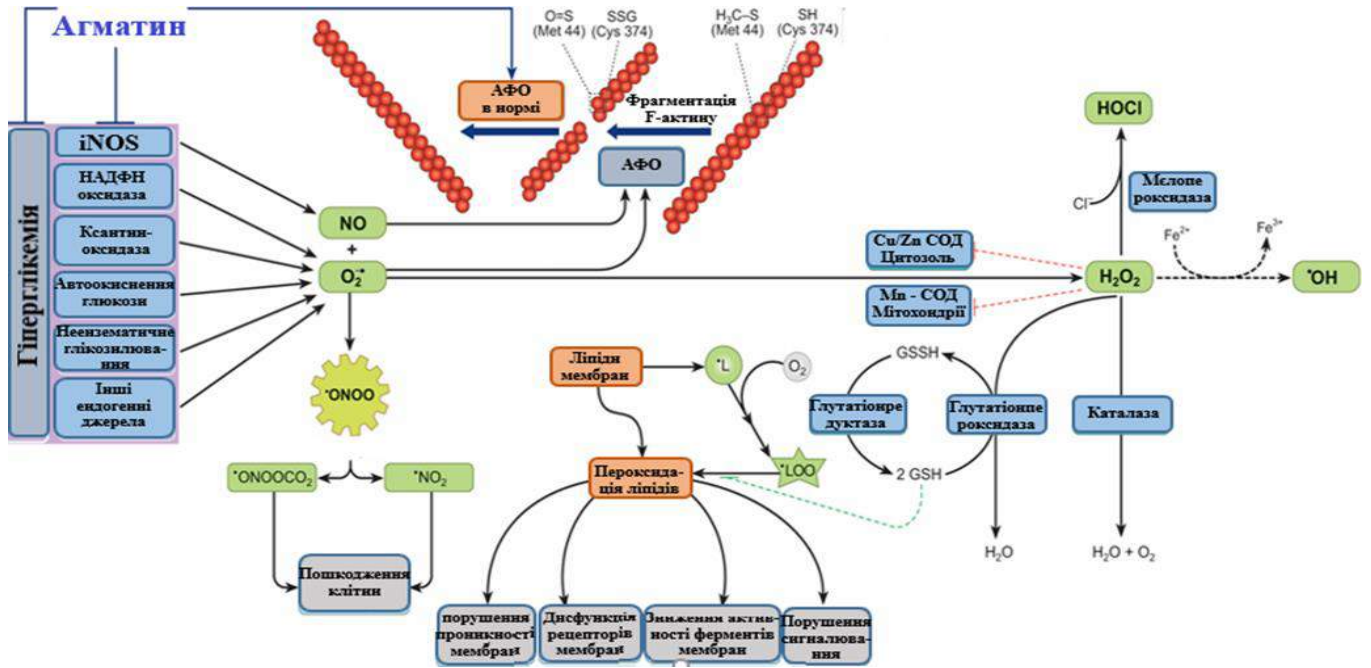


Рис. 9. Узагальнююча схема впливу агматину на окремі показники оксидативно-нітративного стресу та динаміку полімеризації актину у лейкоцитах периферичної крові за умов експериментального цукрового діабету.

Супероксид-аніон вступає в реакцію з NO. Утворюється цитотоксичний пероксинітрит (ONOO^-) та інтенсифікується перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) [Ighodaro O. M. et al., 2017]. Відбувається зниження рівня відновленого глутатіону (GSH) і активності ензимів антиоксидантного захисту. Зростання концентрації АФО і АФН збільшує ймовірність окиснення залишків Cys374 і Met44 у молекулах F-актину. Це призводить до руйнування F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів [Kanga Y. et al., 2016].

Агматин попереджає розвиток оксидативно-нітритивного стресу у лейкоцитах щурів за умов стрептозотоцин-індукованого діабету, оскільки інгібує NO-синтазу, знижуючи надпродукцію NO у лейкоцитах, зменшує інтенсивність процесів ПОЛ, а також сприяє підвищенню активності ключових ензимів антиоксидантного захисту. Проявляючи гіпоглікемічний та антиоксидантний ефект, агматин сприяє підтриманню концентрації АФО і АФН у межах фізіологічної норми. Це забезпечує відновлення балансу між процесами полімеризації і деполімеризації актину в лейкоцитах крові [Papaannopoulos V. et al., 2010]. Це сприяє відновленню міграційної здатності лейкоцитів, яка є вирішальною у виконанні цими клітинами своєї основної функції – забезпеченні ефективного знищення чужорідних антигенів, тобто формуванню адекватної імунної відповіді організму.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень показано позитивний коригуючий вплив агматину на процеси полімеризації-деполімеризації актину, що опосередковують динаміку змін структурно-функціонального стану лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету.

1. За умов ЕЦД вміст кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах зменшувався на 22 %, а у плазмі збільшувався на 32 %, порівняно з контролем, що можна пояснити пригніченням функції транспортера глюкози GLUT 3 за умов гіпоінсулінемії. При введенні агматину за ЕЦД вміст AGEs зростав у лейкоцитах, але зменшувався у плазмі, що пов'язано із здатністю цього поліаміну викликати активацію μ -опіїдних рецепторів і, як наслідок, стимулювати засвоєння глюкози периферичними тканинами.

2. У результаті проведених досліджень встановлено, що введення агматину тваринам з експериментальним цукровим діабетом спричиняє зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів на 20 % та достовірне підвищення активності ферментів антиоксидантної системи: каталази, СОД, ГПО, ГР, а також вмісту GSH порівняно з діабетичною групою. Після введення агматину тваринам з діабетом спостерігали незначне підвищення вмісту кінцевих продуктів оксидації у лейкоцитах та достовірне зменшення їхньої кількості у плазмі порівняно з діабетом, що пов'язано з гіпоглікемічною дією агматину.

3. Показано, що введення агматину контрольним тваринам викликало збільшення агрегаційної здатності лейкоцитів, що може бути пояснене прямою дією агматину на стан їхніх поверхневих глікокон'югатів або на активність ферментів, які формують структуру вуглеводних детермінант адгезивних молекул цих клітин. Спрямованість дії агматину зберігалась і за умов ЕЦД.

4. Методами флюоресцентної мікроскопії та імуноблот-аналізу встановлено зростання вмісту фракції полімеризованого актину в лейкоцитах крові тварин з експериментальним цукровим діабетом. На фоні підвищення загального рівня F-актину зменшується кількість довгих актинових філаментів цитоскелету, водночас зростає вміст коротких філаментів актину, що свідчить про преактивованій стан лейкоцитів. Доведено коригуючий ефект агматину на функціональний стан лейкоцитів, що підтверджується інтенсифікацією процесу формування довгих філаментів актинового цитоскелету.

5. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину трансдукція лектиніндукованого сигналу через сіалоглікокон'югати і динаміка кількісного перерозподілу вмісту фракцій актину вказує на те, що даний поліамін сприяє відновленню і підтриманню нативної структури поверхневих глікокон'югатів, що відповідають за формування функціональної відповіді лейкоцитів на активаційні сигнали.

6. Таким чином, агматин виявляє антиоксидантну, гіпоглікемічну та імуномодулюючу дію і може бути застосований при корекції патологічних станів, що супроводжується гіперглікемією, оксидативно-нітративним стресом і розладом локомоторної функції імунокомпетентних клітин.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Bila I., Dzydzan O., Brodyak I., Sybirna N.** Agmatine prevents oxidative-nitrative stress in blood leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Open Life Sciences*. 2019; 14: 299–310. (IF – 0,583, Scientific Journal Rankings – 0,266). (Дисертант спільно із співавторами провела дослідження та взяла участь в аналізі отриманих даних).

2. Brodyak I. V., **Bila I. I.**, Sybirna N. O. The dynamics of actin filament polymerization in activated leukocytes under experimental diabetes mellitus against the background of agmatine administration rats. *Biopolymers and Cell*. 2017; 33(6): 403–414. (Scopus, Scientific Journal Rankings – 0.417). *(Дисертант виконала клітинно-біологічні дослідження спільно із співавторами та взяла участь в узагальненні та аналізі отриманих результатів).*

3. Бродяк І. В., **Біла І. І.**, Сибірна Н. О. Вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету. *Фізіологічний журнал*. 2017; 63(4): 48–55. (IF – 0.06, Scientific Journal Rankings – 0.130). *(Дисертант проаналізувала та узагальнила літературні джерела, провела експериментальні дослідження та брала участь у статистичній обробці даних, в написанні та оформленні статті).*

4. Бродяк І. В., **Біла І. І.**, Сибірна Н. О. Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актину лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016; 73: 35–40. *(Дисертант спільно із науковим керівником та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, здійснила основні експерименти, узагальнила результати та брала участь у підготовці публікації).*

5. Brodyak I. V., **Bila I. I.**, Overchuk M., Sybirna N. O. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Studia Biologica*. 2014; 8(3–4): 7–30. *(Дисертант виконала клітинно-біологічні дослідження in vitro та спільно із співавторами брала участь у аналізі отриманих даних).*

6. Dzydzan O., **Bila I.**, Ferents I., Brodyak I., Lyuta M., Burda V., Sybirna N. Biochemical effects of agmatine on peripheral blood erythrocytes and leukocytes in diabetes mellitus. *X International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”*, 8–11 April, 2014; Abstracts. Lviv: 2014. P. 53. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді).*

7. Сибірна Н. О., Бродяк І. В., Ференц І. В., **Біла І. І.** Вплив агматину на структурно-функціональний стан лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у щурів. *XI Український біохімічний конгрес*, 6–10 жовтня, 2014; тези. Український біохімічний журнал. 2014. 86(5) (спеціальний випуск, додаток 2, 2014): С. 29–30. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні тез доповіді).*

8. **Bila I.** Overchuk M., Brodyak I., Sybirna N. Agmatine effect on actin polymerization in leukocytes of diabetic rats. 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17–20 вересня 2014 р.: збірник тез. Ужгород: 2014. С. 14. *(Дисертанту належить опрацювання робочої схеми експерименту, аналіз літературних даних і власних результатів, участь у написанні та оформленні тез).*

9. Overchuk M., Brodyak I., Ferents I., **Bila I.**, Klymyshyn N., Sybirna N. Agmatine administration normalizes actin polymerization levels and inhibits leukocyte apoptosis in rats with diabetes mellitus. *International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”*, 20–23 April, 2014; Abstracts. Lviv: 2014. P.

84–85. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні тез доповіді).

10. Біла І., Бродяк І., Сибірна Н. Динаміка полімеризації актинових філаментів лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у разі стимулювання лектином WGA. *Актуальні проблеми сучасної біохімії, присвяченій до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова*, 16–18 листопада 2016: Вісник Львівського університету. Серія біологічна. Львів; 2016. 73: С. 114. (Здобувачем особисто проведено дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготовлено матеріали до друку).

11. Біла І., Бродяк І., Сибірна Н. Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актинового цитоскелету в лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину. *Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”*, 25–27 квітня 2017: збірник тез. Львів: 2017. С. 224–225. (Дисертант спільно із співавторами провела дослідження та взяла участь в аналізі отриманих даних).

12. Brodyak I., Sabadashka M., **Bila I.**, Sybirna N. Effect of agmatine on actin reorganization in WGA-stimulated leukocytes under experimental diabetes mellitus. *7th International Weigl Conference*, September 26–29, 2017: Abstracts. Lviv: 2017. P. 148. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді).

13. Біла І., Бродяк І., Сибірна Н. Динаміка зміни вмісту мономерного актину в активованих лейкоцитах тварин з експериментальним цукровим діабетом на фоні введення агматину. *Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”*, 10–12 квітня 2018: збірник тез. Львів: 2018. С. 88–89. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді).

14. Біла І., Бродяк І., Сибірна Н. Вплив агматину на вміст окремих метаболітів оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах крові за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. *Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”*, 9–11 квітня 2019: збірник тез. Львів: 2019. С. 98-99. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді).

15. **Bila I.** Brodyak I., Sybirna N. State of the Antioxidant System of Blood Leukocytes under Conditions of Experimental Diabetes Mellitus on the Background of Agmatine Injection. *4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*, May 20–24, 2019: Abstracts. Kyiv: 2019. P. 366. (Здобувачем особисто проведено дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготовлено матеріали до друку).

АНОТАЦІЯ

Біла І. І. Вплив агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів за експериментального цукрового діабету. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка Міністерства освіти і науки України, Львів, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню процесів реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів, їхньої агрегаційної та міграційної здатності, біохімічних механізмів розвитку оксидативно-нітративного стресу за умов ЕЦД, а також вивченню можливості корекції таких патологічних змін агматином.

Встановлено, що після введення агматину тваринам з ЕЦД спостерігається збалансоване функціонування антиоксидантної системи, що відображається в змінах активностей СОД, каталази, ГПО, ГР, вмісту відновленого глутатіону та ТБК-позитивних продуктів. З'ясовано, що введення досліджуваного поліаміну хворим тваринами сприяє відновленню досліджуваним показникам нормальних фізіологічних значень у лейкоцитах периферичної крові. Було вперше продемонстровано вплив агматину на перерозподіл фракцій актину, які представлені щільно асоційованими з мембраною філаментами цитоскелету, короткими актиновими філаментами цитоскелету і мономерами актину в лейкоцитах, після преінкубації цих клітин впродовж тридцяти секунд, однієї та трьох хвилин із сіалоспецифічним лектином WGA у контрольній групі тварин та за умов ЕЦД. З'ясовано, що зміни на рівні реорганізації актинового цитоскелету, у результаті полімеризації-деполімеризації актину, зумовлені порушенням трансдукції лектиніндукованого сигналу через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів, кількість та структура яких за умов ЕЦД є зміненою.

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет, лейкоцити, агматин, агрегація, міграція, антиоксидантна система, цитоскелет, актин.

АННОТАЦІЯ

Била И. И. Влияние агматина на агрегационную и миграционную способность лейкоцитов при экспериментальном сахарном диабете. – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко Министерства образования и науки Украины, Львов, 2019.

Диссертация посвящена исследованию процессов реорганизации актинового цитоскелета лейкоцитов, их агрегационной и миграционной способности, биохимических механизмов развития оксидативного-нитративного стресса в условиях ЭСД, а также изучению возможности коррекции таких патологических изменений агматином.

Установлено, что после введения агматина животным с ЭСД наблюдается сбалансированное функционирование антиоксидантной системы, что отображается в изменениях активностей СОД, каталазы, ГПО, ГР, содержания восстановленного глутатиона и ТБК-позитивных продуктов. Установлено, что введение исследуемого полиамина больным животными способствует восстановлению исследуемым показателям нормальных физиологических значений в лейкоцитах периферической крови. Было впервые продемонстрировано влияние агматина на перераспределение фракций актина, которые представлены плотно ассоциированными с мембраной филаментами цитоскелета, короткими актиновыми филаментами цитоскелета и мономерами актина в лейкоцитах, после преинкубации этих клеток в течении тридцати секунд, одной и трёх минут с сialоспецифическим лектином WGA в

контрольной группе животных и при ЭСД. Установлено, что изменения на уровне реорганизации актинового цитоскелета, в результате полимеризации-деполимеризации актина, обусловлены нарушением трансдукции лектининдуцированного сигнала через сиалосодержащие гликоконъюгаты мембран лейкоцитов, количество и структура которых в условиях ЭСД изменяется.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, лейкоциты, агматин, агрегация, миграция, антиоксидантная система, цитоскелет, актин.

SUMMARY

Bila I. I. The effect of agmatine on the ability of leukocytes to aggregate and migrate under experimental diabetes mellitus. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a PhD degree in biological sciences, specialty 03.00.04 – "Biochemistry". – Ivan Franko Lviv National University, Lviv, 2019.

The dissertation is devoted to the study of the effect of agmatine on the aggregation and migration abilities of peripheral blood leukocytes both in control rats and those with experimental diabetes mellitus (EDM) by determining changes in oxidative stress indices and polymerization-depolymerization processes of actin filaments.

The administration of agmatine prevents the development of oxidative stress in rat leukocytes under streptozotocin-induced diabetes, suppresses the formation of active forms of oxygen, reduces the intensity of lipid peroxidation processes and the content of advanced oxidation protein products in plasma, and also increases the activity of the antioxidant system key enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase).

After the injection of agmatine to both healthy and diabetic animals the enhancement of aggregation properties of peripheral blood leukocytes as were observed, which may be explained by the direct action of agmatine either on the state of surface glycoconjugates of leukocyte membrane or on the activity of enzymes which form the structure of carbohydrate determinants of adhesive molecules of these cells. The directed action of agmatine was also kept under the conditions of EDM. Thus it may be assumed that the administration of agmatine to animals with diabetes causes an increase in the affinity of WGA lectin binding to its complementary ligands due to an increase in the number of sialoglycoconjugates and residues of N-acetyl-D-glucosamine in the surface glycans of leukocytes.

The initial level of polymerized actin in rat peripheral blood leukocytes of all the four groups was estimated by the level of fluorescence of phalloidine, which binds F-actin in the ratio of 1: 1 without binding G-actin. The digitized results of the signal intensity of fluorescence microscopy were expressed in conditional units. It was found that the level of F-actin in leukocytes under EDM was significantly higher compared to the control, which indicates their pre-activated condition, the violation of depolymerization processes, changes in structural and functional properties of the cells thus decreasing their migration capacity under diabetes mellitus.

After the injection of agmatine to both the control group of rats and under conditions of streptozotocin-induced diabetes, a decrease in the level of polymerized actin was

observed. Such results in animals with EDM following the injection of the studied polyamine may be attributed to the "removal" of the pre-activation state of cells, the intensification of actin polymerization-depolymerization, which was recorded as an increase in the long actin filaments content, thus increasing the migration capacity of cells.

In leukocytes of animals with EDM against a background of agmatine injection, the transduction of the lectin-induced signal via sialoglycoconjugates and the dynamics of quantitative redistribution of the content of actin fractions indicates that this polyamine helps restore and maintain the functional response of leukocytes to activation signals.

Agmatine prevents the development of oxidative-nitrative stress in rat leukocytes in conditions of streptozotocin-induced diabetes by inhibition NO synthase, decreasing NO overproduction in leukocytes, reducing the intensity of lipid peroxidation processes, and also increasing the activity of key enzymes of antioxidant defense. Agmatine exerts hypoglycemic and antioxidant effects maintaining oxygen and nitrogen active forms concentrations within the limits of the physiological norm. This contributes to the restoration of the balance between the processes of polymerization and depolymerization of actin in blood leukocytes. The increase in the content of the fraction of long filaments of leukocytes' cytoskeleton of animals with EDM confirms this effect of agmatine. The investigation of mechanisms underlying agmatine's influence on the aggregation and migration abilities of blood leukocytes under diabetes mellitus is a high pressing priority since the obtained results may contribute to the development of new approaches to the development of drugs with hypoglycemic, antioxidant and immunomodulatory effects.

Key words: experimental diabetes mellitus, leukocytes, agmatine, aggregation, migration, antioxidant system, cytoskeleton, actin.