

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА**

Кваліфікаційна наукова  
Праця на правах рукопису

**БІЛА ІВАННА ІВАНІВНА**

УДК 576.321.36

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

03.00.04 – біохімія

подається на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

І. І. Біла

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: **Сибірна Наталія Олександрівна**, доктор біологічних  
наук, професор, завідувач кафедри біохімії

Львів – 2019

## АНОТАЦІЯ

**Біла І. І. Вплив агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів за експериментального цукрового діабету. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «Біохімія». – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2019.

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД), шляхом визначення змін показників оксидативного стресу та процесів полімеризації-деполімеризації актинових філаментів.

Досліджено, що за умов діабету вміст кінцевих продуктів глікації (від *анг.* advanced glycation end-products, AGEs) у лейкоцитах зменшувався на 22 %, а у плазмі – збільшувався на 32 %, порівняно з контрольною групою. 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.

У лейкоцитах тварин з експериментальним цукровим діабетом спостерігали зростання кількості ТБК-позитивних продуктів у 1,4 раза порівняно з контролем. Введення агматину хворим щурам спричиняло нормалізацію цього показника до контрольних значень. Отже, дія досліджуваного поліаміну спрямована на зниження інтенсивності накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів.

Гіперглікемія при цукровому діабеті також спричиняє посилення утворення кінцевих продуктів оксидації (від *анг.* advanced oxidation protein products, AOPPs). За умов діабету, ми спостерігали підвищення вмісту AOPPs у плазмі приблизно в 1,6 раза порівняно з контролем, а у лейкоцитах достовірних змін не відбувалось. Після введення агматину здоровим щурам рівень AOPPs у плазмі значно підвищився, порівняно з контрольною групою, у лейкоцитах не змінився. Після

введення агматину тваринам з цукровим діабетом не спостерігали змін у вмісті продуктів окисації у лейкоцитах та достовірне зменшення їхньої кількості у плазмі порівняно з діабетом. Введення агматину тваринам з цукровим діабетом призводить до зменшення концентрації глюкози в периферичній крові до фізіологічного рівня, що зумовлює зниження рівня AOPPs у плазмі крові.

У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази достовірно знижується у лейкоцитах крові щурів за умов ЕЦД. Введення агматину щурам контрольної групи не спричиняло достовірних змін в активності антиоксидантних ензимів. Після введення агматину тваринам з ЕЦД спостерігали достовірно підвищення активності СОД і каталази порівняно з діабетичною групою.

За умов діабету зниження активності глутатіонпероксидази (ГПО), яка окиснює глутатіон, відновлюючи гідропероксиди ліпідів та інших органічних сполук, тісно пов'язане із функціонуванням глутатіонредуктази (ГР) та рівнем відновленого глутатіону (GSH). Нами виявлено, що введення агматину тваринам з ЕЦД обумовлювало підвищення активності досліджуваних ферментів та зростання рівня GSH до значень контролю. Введення агматину попереджає розвиток оксидативного стресу в лейкоцитах щурів за стрептозотоцинового діабету, пригнічуючи утворення активних форм кисню, знижує інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів, вмісту кінцевих продуктів окисації у плазмі, а також сприяє підвищенню активності ключових ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази).

За умов цукрового діабету у разі використання як індуктора агрегації лектину WGA ступінь і швидкість агрегації лейкоцитів зростали в 2,0 рази та 2,4 рази, відповідно, порівняно зі значеннями у контрольній групі. Такі зміни ми можемо пояснити синтезом гібридних типів N-гліканів та незавершеністю процесу глікозилування білків і ліпідів.

Після введення агматину здоровим тваринам і тваринам з цукровим діабетом, ми спостерігали посилення агрегаційної здатності лейкоцитів периферичної крові

досліджуваних тварин, що може бути пояснене прямою дією агматину на стан поверхневих глікокон'югатів мембран лейкоцитів або на активність ферментів, які формують структуру вуглеводних детермінант адгезивних молекул цих клітин. Спрямованість дії агматину зберігалась і за умов ЕЦД. Ми припускаємо, що введення агматину тваринам з цукровим діабетом зумовлює посилення афінності зв'язування лектину WGA з його комплементарними лігандами, внаслідок збільшення кількості сіалоглікокон'югатів і залишків N-ацетил-D-глюкозаміну у складі поверхневих гліканів лейкоцитів.

Зміна інтенсивності процесу і способу полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах у разі ЕЦД може вказувати на порушення міграційної здатності цих клітин, адже саме актиновий цитоскелет лейкоцитів постійно реорганізовується, виступаючи динамічною системою, яка визначає морфо-функціональні зміни у клітин.

За рівнем флюоресценції фалоїдину, який зв'язує F-актин у співвідношенні 1:1, не зв'язуючи при цьому G-актин, ми оцінили вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові щурів усіх чотирьох досліджуваних груп тварин. Оцифровані результати інтенсивності сигналів флюоресцентної мікроскопії на знімках виражали в у.о. Аналізуючи результати проведених досліджень, було встановлено, що рівень F-актину в лейкоцитах крові за ЕЦД був достовірно вищим порівняно з контролем, що вказує на їхній преактивований стан, порушення процесів деполімеризації, зміну структурно-функціональних властивостей цих клітин у разі діабету і може бути причиною зниження їхньої міграційної здатності.

Після введення агматину у контрольній групі щурів та за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету спостерігали зменшення рівня полімеризованого актину. Такі значення у тварин із ЕЦД на фоні введення досліджуваного поліаміну можуть бути зумовлені “зняттям” стану преактивованості клітин, інтенсифікацією процесів полімеризації-деполімеризації актину, що фіксувалося як зростання вмісту довгих актинових філаментів і, як наслідок, відбувається підвищення міграційної здатності клітин.

Методом імуноблот-аналізу було визначено загальний вміст актину в лейкоцитах кожної із досліджуваних груп. Вміст актину у лейкоцитах контрольної групи тварин було прийнято за 100 %. У разі ЕЦД загальний вміст актину у лейкоцитах знижувався на 24 % щодо контролю. У тварин з ЕЦД після введення агматину спостерігали зростання вмісту актину в сумарній фракції лізатів лейкоцитів на 46 % порівняно з ЕЦД.

Порівняльний аналіз перерозподілу між фракціями актину: філаментами цитоскелету, короткими актиновими філаментами та мономерами актину дав змогу виявити, що в клітинах контрольної групи тварин полімеризований актин домінує щодо мономерів актину у співвідношенні 8 : 2.

У разі ЕЦД лейкоцити характеризуються високим вмістом коротких філаментів та низьким вмістом довгих філаментів цитоскелету порівняно з контролем, а вміст полімеризованого актину щодо мономерів актину співвідноситься як 9 : 1. Саме високий вміст субмембранних коротких актинових філаментів, які розташовуються в кортикальному шарі клітини, зумовлює зміну морфології та функції лейкоцитів у разі діабету і є молекулярною основою зниження міграційної здатності, оскільки формування виростів мембрани не відбувається.

Після введення агматину співвідношення полімеризованого актину до мономерів актину становить 9 : 1 у контролі та 8,5 : 1,5 при діабеті. Отримані дані вказують на те, що введення цього поліаміну тваринам діабетичної групи спричиняє полімеризації актину цитоскелету лейкоцитів з використанням як праймера коротких філаментів актину.

Оскільки на поверхні лейкоцитів адгезивні молекули і рецептори за біохімічною природою є глікокон'югатами з високим ступенем сіалювання, що через мембранні структури і сигнальні білки взаємодіють із білками цитоскелету, тому динаміку полімеризації-деполімеризації актинових філаментів ми оцінювали після тридцяти секунд, однієї та трьох хвилин преінкубації лейкоцитів із лектином зародків пшениці (WGA) у нормі та за умов ЕЦД, щоб оцінити швидкість передачі сигналу по внутрішній мережі. Після того, як лектин WGA

зв'язується з комплементарними глікокон'югатами на поверхні лейкоцитів, індукується система трансдукції сигналу від мембрани до цитоплазматичних білків, що призводить до активації цитоскелетних структур.

Лектин WGA взаємодіє зі залишками сіалових кислот і N-ацетил- $\beta$ ,D-глюкозаміну, які наявні в термінальних позиціях глікопротеїнів і гліколіпідів. Авідність зв'язування молекул адгезії з їхніми комплементарними лігандами і, відповідно, агрегаційна, адгезивна та міграційна здатність залежить від реорганізації цитоскелету лейкоцитів.

У контрольній групі тварин динаміка стимуляції лектином WGA вказує на чітко виражений пік полімеризації актину на 1 хв і його деполімеризацію на 3 хв. Очевидно, включення сигнальної мережі, що приводить до реорганізації цитоскелету цих клітин, у таких експериментальних умовах відбувалося за 1 хв.

У тварин з ЕЦД стимулювальний ефект лектину WGA теж викликав формування піку полімеризації актину на 1 хв. Зменшення вмісту F-актину в 1,5 раза на третю хвилину відображає незавершений процес деполімеризації актинових філаментів. В діабетичній групі на фоні введення агматину пік полімеризації актину спостерігався вже на 30 с стимулювання і відбувався дуже стрімкий процес деполімеризації на 1 хв після дії лектину.

Динаміка перерозподілу вмісту фракцій актину у лізатах лейкоцитів у стані спокою (0 хв) і у стані активації (0,5, 1 та 3 хв) вказує на те, що у клітинах тварин контрольної групи процес полімеризації актину за умов активації лейкоцитів способом преінкубації з лектином WGA, на 0,5 хв інтенсифікується із залученням фракції коротких актинових філаментів, а на 1 хв – філаментів цитоскелету. Така динаміка полімеризації актину, яка оцінювалася методом імуноблот-аналізу, відповідає стану активації цих клітин крові у разі дії стимулювальних чинників.

В лейкоцитах тварин з ЕЦД на 0,5 хв стимулювання лектином WGA процес полімеризації актину інтенсифікується із залученням фракції філаментів цитоскелету. У момент активації лейкоцитів, з коротких філаментів актину розпочинається полімеризація довгих ниток F-актину, що призводить до формування ламелоподій на їхній поверхні. Тому вміст коротких філаментів

актину знижується, а вміст актинових мономерів за цих умов не змінювався. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на 1 і 3 хв після дії лектину WGA рівень F-актину фракції філаментів цитоскелету не зазнавали достовірних змін, проте відбувалося посилення процесу деполімеризації актину, представленого короткими філаментами, внаслідок чого збільшувався вміст мономерів актину з 9 % до 30 % на 3 хв впливу лектину WGA.

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину динаміка формування відповіді на стимулювальний вплив лектину WGA характеризувалася інтенсифікуванням полімеризації актину з утворенням фракції філаментів цитоскелету вже на 0,5 хв впливу лектину, дуже стрімким процесом деполімеризації на 1 хв після дії лектину та повернення показників до рівня характерного для вихідного стану у разі дії лектину впродовж 3 хв.

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 функціональної відповіді лейкоцитів на активаційні сигнали.

В результаті досліджень кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка було встановлено, що за умов гіперглікемії надмірне утворення радикала супероксид-аніона ( $O_2^{\cdot-}$ ) у результаті автоокиснення глюкози, неензиматичного глікозилювання білків, інтенсифікації електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, підвищення активності ксантинооксидази, НАДФН-оксидази, інших метаболічних процесів та надпродукція оксиду нітрогену іNO-синтазою призводять до розвитку оксидативно-нітративного стресу. Супероксид-аніон вступає в реакцію з NO. Утворюється цитотоксичний пероксинітрит ( $ONOO^-$ ) та інтенсифікується перекисне окиснення ліпідів. Відбувається зниження рівня відновленого глутатіону (GSH) і активності ензимів антиоксидантного захисту. Зростання концентрації активних форм кисню та активних форм нітрогену збільшує ймовірність окиснення залишків Cys374 і Met44 у молекулах F-актину. Це

призводить до руйнування F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів.

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 перекисного окиснення ліпідів, а також сприяє підвищенню активності ключових ензимів антиоксидантного захисту. Проявляючи гіпоглікемічний та антиоксидантний ефект, агматин сприяє підтриманню концентрації активних форм кисню та активних форм нітрогену у межах фізіологічної норми. Це сприяє відновленню балансу між процесами полімеризації і деполімеризації актину в лейкоцитах крові. Підтвердженням цього ефекту агматину є виявлене нами підвищення вмісту фракції довгих філаментів цитоскелету лейкоцитів тварин з ЕЦД. Дослідження механізмів впливу агматину на агрегаційну та міграційну здатність лейкоцитів крові при цукровому діабеті є пріоритетними та актуальними, а отримані результати можуть сприяти розробці нових підходів у створенні препаратів з гіпоглікемічною, антиоксидантною та імуномодуючою дією.

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



It has been revealed that the content of advanced glycation end-products (AGEs) decreased by 22 % in leukocytes and increased by 32 % in plasma under experimental conditions of diabetes compared with the control group. The injection of agmatine to healthy animals did not lead to significant changes in the content of AGEs. Following the injection of agmatine to animals with diabetes, there was a decrease in this index in plasma by 1.8 times, and a significant increase in the content of glycation products in leukocytes almost up to the control values.

In leukocytes of animals with experimental diabetes, an increase by 1.4 times in the number of TBA-positive products was observed compared to control, whereas the injection of agmatine to diabetic rats caused the normalization of this indicator to control values. Therefore, the effect of the studied polyamine is directed at reducing the intensity of lipid peroxidation products accumulation.

Hyperglycemia under diabetes mellitus also causes an increased formation of advanced oxidation protein products (AOPPs). In conditions of diabetes, we observed an increase in the content of AOPPs in plasma by about 1.6 times compared with control, whereas there were no significant changes in leukocytes. After the administration of agmatine to healthy rats the AOPPs level in plasma considerably increased compared with the control group, whereas this indicator remained unchanged in leukocytes. There were neither changes in the content of oxidation products in leukocytes nor significant decrease in their amounts in plasma compared with the diabetic group following the administration of agmatine to diabetic animals. However, the administration of agmatine to animals with diabetes leads to a decrease in the glucose level to the physiological level, thus decreasing the content of AOPPs in plasma.

The findings from the research indicate that under EDM superoxide dismutase (SOD) and catalase activities were significantly reduced in rat blood leukocytes, whereas the administration of agmatine to the rats of the control group did not lead to significant changes in the activity of the antioxidant enzymes. There was a significant increase in the activity of SOD and catalase in leukocytes of animals with EDM after the administration of agmatine compared with the control group.

Glutathione peroxidase (GPO) is an enzyme which oxidizes glutathione restoring lipids, hydroperoxides and other organic compounds. Under conditions of diabetes, a decrease in the activity of GPO is closely related to the activity of glutathione reductase (GR) and the level of reduced glutathione (GSH). It was shown that the injection of agmatine to animals with EDM caused an increase in the activity of the studied enzymes as well as an increase in the level of GSH to the control values. 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).

Under diabetes mellitus, when WGA lectin was used as an inducer of aggregation the degree and rate of leukocyte aggregation increased by 2.0 and 2.4 times respectively, compared with the control group. Such changes may be attributed to the presence of carbohydrate determinants in the structure of the glycoprotein receptor of leukocyte membranes in animals with diabetes type 1 diabetes (in an elevated number compared with healthy animals), which contain predominantly N-acetyl- $\beta$ , D-glucosamine and N-acetylneuramic fragments in their structures. The features of the glycoconjugates' terminal residues of the leukocytes' plasma membrane under the pathology can affect both the dynamic and the kinetic parameters of the cell aggregation. In addition, the obtained results may be related to the intensification of hybrid type N-glycans synthesis with the activated GnTII-enzyme (N-acetylglucosamine-transferase III).

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.

Changes in the intensity and way of actin polymerization-depolymerization in leukocytes under EDM may indicate the violation of migration capacity of these cells, since the actin cytoskeleton of leukocytes is constantly being reorganized, acting as a dynamic system that determines morphofunctional changes in the cell.

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.

The total content of actin in leukocytes of each of the studied groups was determined by the method of immunoblot analysis.. The content of actin in leukocytes of the control group of animals was taken as 100 %. Under EDM, the total content of actin in leukocytes decreased by 24 % in comparison with the control. In animals with EDM, after the injection of agmatine, there was an increase of 46 % in the content of actin in the total fraction of leukocyte lysates compared to EDM.

The comparative analysis of the redistribution of actin fractions among long cytoskeleton filaments, short actin filaments and actin monomers allowed us to find out

that polymerised actin dominates actin monomers in the cells of the control group of animals in the ratio of 8 : 2.

Under EDM, leukocytes are characterized by a high content of short filaments and a low content of long cytoskeleton filaments, compared to the control, whereas the level of polymerized actin correlates to actin monomers in the ratio of 9 : 1. It is the high content of submembrane short actin filaments, which are located in the cortical layer of the cell, that causes changes in the morphology and functions of leukocytes under diabetes and provides the molecular basis for the reduction of migration capacity, since the formation of membrane ramifications does not occur.

After the injection of agmatine, the polymerized actin dominates actin monomers in the ratio of 9 : 1 in the control and 8.5 : 1.5 in the diabetic group of animals correspondingly. The obtained results indicate that the administration of this polyamine to animals with diabetes induces the actin polymerisation of leukocyte cytoskeleton using short actin filaments as the primer.

Since adhesion molecules and receptors on the surface of leukocytes are glycoconjugates with a high level of sialization by their biochemical nature, which interact with cytoskeleton proteins through membrane structures and signal proteins, the dynamics of polymerization-depolymerization of actin filaments was evaluated after thirty seconds, one and three minutes of leukocyte preincubation with the lectin of wheat germs (WGA) in the control and diabetic groups to estimate the signal transmission rate over the internal network. After WGA lectin binding to complementary glycoconjugates on the surface of leukocytes, the system of signal transduction from the membrane to the cytoplasmic proteins is induced, which leads to the activation of cytoskeleton structures.

WGA lectin interacts with residues of sialic acids and N-acetyl- $\beta$ , D-glucosamine, which are available in terminal positions of glycoproteins and glycolipids. The avidity of adhesion molecules bindings to their complementary ligands and, consequently, the ability of leukocytes to aggregate, adhere and migrate depends on the reorganization of their cytoskeleton. In the control group of animals, the dynamics of leukocytes stimulation with WGA lectin indicates a well-defined peak of actin polymerization at min. 1 and its depolymerization at min. 3. Obviously, under such experimental conditions

the launching of the signaling network, which leads to the reorganization of the cytoskeleton of these cells, occurred within 1 min.

In animals with EDM, the stimulatory effect of WGA lectin also led to the formation of the peak of actin polymerization at min. 1. The reduction of the content of F-actin by 1.5 times at min. 3 reflects the incomplete process of actin filament depolymerization. In the diabetic group against a background of agmatine administration, the peak of actin polymerization was observed at sec. 30 of stimulation followed by a very rapid depolymerization process at min. 1 of the lectin influence.

The dynamics of redistribution of actin fractions in leukocyte lysates both in the rest condition (min. 0) and the activation state (min. 0.5, 1 and 3) indicates that the process of actin polymerisation under leukocytes activation with WGA lectin at min. 0.5 intensifies with the recruitment of the short actin filament fraction and at min. 1 - of the cytoskeleton filaments in the control animals. Such dynamics of actin polymerization, which was evaluated by the method of immunoblot analysis, corresponds to the state of leukocyte activation in conditions of stimulatory factors.

In leukocytes under EDM, actin polymerization process is also intensified with the recruitment of the cytoskeleton filament fraction of at min. 0.5 of WGA lectin stimulation. As soon as leukocytes are activated, the process of actin polymerization from short filaments to long filaments of F-actin begins, which leads to the formation of lamellipods on their surface. Therefore, the content of short actin filaments decreases, whereas the content of actin monomers in these conditions remains unchanged. In leukocytes of animals with EDM, at min.1 and min. 3 following the action of WGA lectin, the level of F-actin of the fraction of cytoskeletal filaments did not undergo significant changes. However, there was an increase in the process of depolymerization of actin represented by short filaments, resulting in an increase in the content of actin monomers from 9 % to 30 % at min. 3 of WGA lectin stimulation.

In leukocytes of animals with EDM against a background of agmatine injection, the dynamics of the response to the stimulatory effect of WGA lectin was characterized by the intensification of actin polymerization with the formation of the fraction of cytoskeletal filaments already at min. 0.5 of lectin exposure, a very rapid

depolymerization process at min. 1 following the lectin effect and the return of the indices to the baseline level within 3 minutes of the lectin action. The reorganization of actin cytoskeleton almost reaches the indicators of actin reorganization in activated leukocytes in the control group of animals.

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.

Therefore, the findings from the research work of the Biochemistry Department of the Ivan Franko National University of Lviv reveal that in conditions of hyperglycemia excessive formation of radical superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) owing to glucose auto-oxidation, non-enzymatic glycosylation of proteins, intensification of the electron transport chain of mitochondria, an increase in xanthine oxidase and NADPH-oxidase activities, as well as other metabolic processes and over-production of nitrogen oxide by iNO-synthase, lead to the development of oxidative-nitrative stress. Superoxide anion reacts with NO, forming cytotoxic peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) and intensifying lipid peroxide oxidation. There is a decrease in the level of reduced glutathione (GSH) and the activity of enzymes of the antioxidant defense system. The growth of oxygen and nitrogen active forms increases the probability of Cys374 and Met44 residues oxidation in F-actin molecules. This leads to the destruction of F-actin cytoskeleton, affecting the locomotor and protective functions of leukocytes.

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. Agmatin 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.

### Список публікацій здобувача

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

**2. Brodyak I. V.** The dynamics of actin filament polymerization in activated leukocytes under experimental diabetes mellitus against the background of agmatine administration rats / I. V. Brodyak, **I. I. Bila**, N. O. Sybirna. *Biopolymers and Cell*. 2017. Vol. 33, № 6. P. 403–414. (Scopus, Scientific Journal Rankings = 0.417). (Здобувач виконала клітинно-біологічні дослідження спільно із співавторами та взяла участь в узагальненні та аналізі отриманих результатів).

**3. Бродяк І. В.** Вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету / І. В. Бродяк, **І. І. Біла**, Н. О. Сибірна. *Фізіологічний журнал*. 2017. Т. 63, № 4. С. 48–55. (IF – 0.06, Scientific Journal Rankings – 0.130). (Здобувач спільно із науковим керівником та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, здійснила основні експерименти, узагальнила результати та брала участь у підготовці публікації).

**4. Бродяк І. В.** Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актину лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету / І. В. Бродяк, **І. І. Біла**, Н. О. Сибірна. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016. Вип. 73. С. 35–40. (Здобувач 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. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats / I. V. Brodyak, **I. I. Bila**, M. Overchuk, N. O. Sybirna. *Studia Biologica*. 2014. Т. 8, № 3–4. С. 17–30. (Здобувач виконала клітинно-біологічні дослідження *in vitro* та спільно із співавторами брала участь у аналізі отриманих даних).

6. Dzydzan O. Biochemical effects of agmatine on peripheral blood erythrocytes and leukocytes in diabetes mellitus / O. Dzydzan, **I. Bila**, I. Ferents, I. Brodyak, M. Lyuta, V. Burda, N. Sybirna // X International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, 8–11 April, 2014: Abstracts. Lviv, 2014. P. 53.

7. Сибірна Н. О. Вплив агматину на структурно-функціональний стан лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у щурів / Н. О. Сибірна, I. В. Бродяк, I. В. Ференц, **I. I. Біла** // XI Український біохімічний конгрес, 6–10 жовтня, 2014 р. : тези. – Український біохімічний журнал. 2014. Т. 86, № 5 (спеціальний випуск, додаток 2, 2014). С. 29–30.

8. Bila I. Agmatine effect on actin polymerization in leukocytes of diabetic rats / **I. Bila**, M. Overchuk, I. Brodyak, N. Sybirna // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17–20 вересня 2014 р.: збірник тез. Ужгород, 2014. С. 14.

9. Overchuk M. Agmatine administration normalizes actin polymerization levels and inhibits leukocyte apoptosis in rats with diabetes mellitus / M. Overchuk, I. Brodyak, I. Ferents, **I. Bila**, N. Klymyshyn, N. Sybirna // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 20–23 квітня 2015 р.: збірник тез. Львів, 2015. С. 84–85.

10. Біла І. Динаміка полімеризації актинових філаментів лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у разі стимулювання лектином WGA / **I. Біла**, I. Бродяк, Н. Сибірна // Актуальні проблеми сучасної біохімії, присвяченій до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова,



16–18 листопада 2016 р.: Вісник Львівського університету. Серія біологічна, випуск 73. Львів, 2016. С. 114.

**11.** Біла І. Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актинового цитоскелету в лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину / **І. Біла**, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 25–27 квітня 2017 р.: збірник тез. Львів, 2017. С. 224–225.

**12.** Brodyak I. Effect of agmatine on actin reorganization in WGA-stimulated leukocytes under experimental diabetes mellitus / I. Brodyak, M. Sabadashka, **I. Bila**, N. Sybirna // 7<sup>th</sup> International Weigl Conference, September 26–29, 2017: Abstracts. Lviv, 2017. P. 148.

**13.** Біла І. Динаміка зміни вмісту мономерного актину в активованих лейкоцитах тварин з експериментальним цукровим діабетом на фоні введення агматину / **І. Біла**, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 10–12 квітня 2018 р.: збірник тез. Львів. 2018. С. 88–89.

**14.** Біла. І. Вплив агматину на вміст окремих метаболітів оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах крові за умов стрептозоточин-індукованого цукрового діабету / **І. Біла**, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 9–11 квітня 2019 р.: збірник тез. Львів. 2019. С. 58.

**15.** Bila I. State of the antioxidant system of blood leukocytes under conditions of experimental diabetes mellitus on the background of agmatine injection / **I. Bila**, I. Brodiak, N. Sybirna // 4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, May 20–24, 2019: Abstracts. Kyiv, 2019. P. 366.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b> .....	21
<b>ВСТУП</b> .....	23
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	29
1.1. Етіологія, генетичні передумови виникнення та патогенез цукрового діабету 1-го типу .....	29
1.1.1. Патофізіологічні механізми розвитку цукрового діабету .....	31
1.1.2. Ускладнення цукрового діабету .....	33
1.2. Структура та функціональні властивості лейкоцитів у нормі та за умов ЦД 1-го типу .....	35
1.2.1. Загальна характеристика та функції лейкоцитів .....	35
1.2.2. Порушення функціонального стану лейкоцитів за умов цукрового діабету .....	36
1.2.3. Трансендотеліальна міграція лейкоцитів .....	37
1.3. Реорганізація актинового цитоскелету лейкоцитів як основа руху клітини.....	41
1.3.1. Молекулярні механізми процесу полімеризації актинових філаментів лейкоцитів .....	42
1.4. Виникнення оксидативного, нітративного та карбонільного стресів за умов експериментального цукрового діабету .....	49
1.5. Метаболічні ефекти агматину .....	53
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	56
2.1. Умови проведення дослідів.....	56
2.2. Об'єкт досліджень.....	56
2.3. Забір крові дослідних тварин .....	57
2.4. Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом.....	57

2.5. Виділення сумарної фракції лейкоцитів з периферичної крові щурів .	58
2.6. Визначення кількості лейкоцитів .....	58
2.7. Отримання лізатів лейкоцитів .....	58
2.8. Дослідження агрегаційної здатності лейкоцитів .....	59
2.9. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі .....	59
2.10. Дослідження активності ферментів системи антиоксидантного захисту.....	60
2.10.1. Визначення супероксиддисмутазної активності .....	60
2.10.2. Визначення каталазної активності .....	61
2.10.3. Визначення глутатіонпероксидазної активності .....	62
2.10.4. Визначення глутатіонредуктазної активності.....	63
2.11. Дослідження проявів карбонільно-оксидативного стресу.....	64
2.11.1. Визначення вмісту відновленого глутатіону .....	64
2.11.2. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів .....	65
2.11.3. Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації (AOPPs).....	66
2.11.4. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікації (AGEs) .....	67
2.12. Дослідження реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів.....	67
2.12.1. Кількісна оцінка вмісту полімеризованого актину методом флюоресцентної мікроскопії з використанням фалоїдину Alexa Fluor 350.....	67
2.12.2. Фракціонування актину в лізатах лейкоцитів .....	68
2.12.3. Електрофорез білків лізатів лейкоцитів у поліакриламідному гелі.....	69
2.12.4. Імоноблотинг білків лізатів лейкоцитів .....	70
2.13. Статистична обробка результатів .....	71
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>72</b>
3.1. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів глікації (AGEs) у лейкоцитах та плазмі периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД .....	72

3.2. Дослідження впливу 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) та активності ферментів системи антиоксидантного захисту .....	74
3.3. Визначення впливу агматину на функціональний стан лейкоцитів крові щурів у нормі та за умов ЕЦД шляхом дослідження WGA-індукованої агрегації клітин .....	81
3.4. Дослідження процесів полімеризації-деполімеризації актину у лейкоцитах щурів для оцінки міграційної здатності імунокомпетентних клітин крові у всіх досліджуваних групах .....	84
3.5. Вплив агматину на трансдукцію лектиніндукованих сигналів через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів щурів у нормі та за умов ЕЦД, які викликають реорганізацію структурних елементів цитоскелету лейкоцитів .....	92

## **РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

<b>ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	103
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	121
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	123
<b>ДОДАТКИ</b> .....	145

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АОС – антиоксидантна система;  
АФН – активні форми нітрогену;  
АФО – активні форми кисигену;  
БСА – бичачий сироватковий альбумін;  
ГДФ – гуанозиндифосфат;  
ГПО – глутатіонпероксидаза;  
ГР – глутатіонредуктаза;  
ГТФ – гуанозинтрифосфат;  
ДАО – діаміноксидаза;  
ДТНБК (5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойна кислота) – реактив Елмана;  
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота;  
ЕЦД – експериментальний цукровий діабет;  
ЗФР – забуферений фізіологічний розчин;  
iNOS – індукцйбельна синтаза оксиду нітрогену;  
ІЛ – інтерлейкін;  
ІФН – інтерферон;  
МДА – малоновий діальдегід;  
НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид;  
НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат;  
ОС – оксидативний стрес;  
ПААГ – поліакриламідний гель;  
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;  
СТЦ – стрептозотоцин;  
ТБК – тіобарбітурова кислота;  
ТРФ – фактора росту тромбоцитів;  
ТХО – трихлороцтова кислота;  
ФІФ<sub>3</sub> – фосфоінозитолтрифосфат;

ФІФ<sub>2</sub> – фосфоінозитолдифосфат;  
ФНП – фактор некрозу пухлин;  
AGEs (advanced glycation end products) – кінцеві продукти глікації;  
AldDH - альдегід дегідрогеназа;  
AOPPs (advanced oxidation protein products) – кінцеві продукти оксидації білків;  
APS (ammonium persulfate) – персульфат амонію;  
СОД – супероксиддисмутаза;  
GSH – відновлений глутатіон;  
GSSG – окиснений глутатіон;  
HLA (human leukocyte antigen) – людський лейкоцитарний антиген;  
ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1, CD54) – молекула адгезії;  
MAPK – мітоген-активуючі протеїнові кінази;  
NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β-cells) – ядерний фактор κB;  
NO – оксид (II) нітрогену;  
PI-3'-K – фосфатидилінозитол-3'-кіназа;  
RAGE (receptor for advanced glycation end products) – рецептор кінцевих продуктів глікації;  
SDS (sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфату натрію;  
VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) – молекула адгезії;  
WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) – білки родини синдрому Віскотта-Олдрича;  
WGA (wheat germ agglutinin) – лектин зародків пшениці.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Цукровий діабет (ЦД) – хвороба, для якої характерна наявність метаболічних порушень багатофакторної етіології [210]. Клінічні та експериментальні дослідження крові людей, хворих на ЦД та тварин із стрептозотоциніндукованим діабетом демонструють значні порушення морфофункціонального стану імунокомпетентних клітин крові. Зниження здатності до хемотаксису, а також фагоцитарної і бактерицидної активності лейкоцитів, що корелює з високим рівнем глюкози в крові, призводять до розвитку інфекційно-запальних процесів, ускладнюючи перебіг основного захворювання [3].

Патогенез дисфункцій клітин крові у разі цукрового діабету 1-го типу є складним і недостатньо вивченим. Мікро- і макроангіопатії, які розвиваються за умов діабету, поряд із прискореним прогресуванням атеросклерозу, супроводжуються порушенням кровообігу, підвищеним тромботичним ризиком і є причинами раптової смерті людей, хворих на діабет. Найважливішими функціональними змінами, які викликають ангіопатії, є підвищення проникності судинних стінок, гемодинамічні розлади, зміни в'язкості крові і дисфункції адгезивної, агрегаційної і міграційної здатності лейкоцитів. Всі ці зміни є узалежненими від морфофункціонального стану імунокомпетентних клітин [93, 185, 210].

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 [38, 77]. Реорганізація актинового цитоскелету в результаті полімеризації-деполімеризації актину має важливе значення для здійснення локомоторних функцій лейкоцитів і

є ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності імунокомпетентних клітин.

Однією з причин зміни динаміки процесу полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах крові за умов ЕЦД є розвиток оксидативно-нітративного стресу. В умовах стресу надмірне окиснення протеїнів призводить до руйнування F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів [50, 136, 221]. Надпродукція активних форм кисню та активних форм нітрогену збільшує ймовірність окиснення тіолових груп мономерів тубуліну, а також сприяє утворенню дисульфідних зв'язків між  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліном, зменшуючи здатність мікротрубочок до полімеризації та порушуючи структуру актину [135]. У молекулах F-актину мішенями дії окиснювальних молекул є залишки Cys374 і Met44, окиснення яких призводить до деполімеризації актинових філаментів [122]. 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 декарбоксилювання L-аргініну [81, 82, 164].

Відмінною особливістю агматину порівняно з іншими цукрознижувальними агентами є те, що однією з його фізіологічних функцій є здатність інгібувати активність індукцйбельної ізоформи синтази оксиду азоту (iNOS) [43, 81, 116]. Агматин в організмі діє як нейротрансмітер і нейромодулятор, є ендогенним лігандом для імідазольних рецепторів ( $I_1/I_2$ ) і, з меншою афінністю, для  $\alpha_2$ -адренорецепторів, N-метил-D-аспартат і серотонінових рецепторів [175]. Одним із біологічних ефектів агматину в організмі, що реалізуються рецептор-опосередкованим шляхом, є здатність впливати на метаболізм глюкози за умов її підвищеної концентрації. Дослідження механізмів впливу агматину на агрегацію 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 імуномодуючою 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 темою: “Біохімічні механізми розвитку, діагностики та корекції діабетіндукованого оксидативно-нітративного стресу” упродовж 2017-2019 років (номер держреєстрації 0117U001225).

**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 (ПОЛ), агрегація лейкоцитів.

**Методи дослідження:** біохімічні (визначення активності ензимів, вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, вмісту відновленого глутатіону, 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 преактивованій стан цих клітин у разі діабету. У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні зниження загального рівня актину зменшується кількість 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 щирю 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.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Етіологія, генетичні передумови виникнення та патогенез цукрового діабету 1-го типу

Цукровий діабет (ЦД) – захворювання, яке проявляється розвитком хронічної гіперглікемії, що призводить до порушення всіх ланок обміну речовин, численних ушкоджень та дисфункції органів. Як причина смерті і за розповсюдженістю ЦД займає третє місце в світі після серцево-судинних і онкологічних захворювань. За різними джерелами налічується від 120 до 180 млн хворих на ЦД, що складає 2–3 % від всього населення планети. За сьогоdnішніми прогнозами кожні 15 років очікується двократне збільшення числа хворих. Актуальність проблеми боротьби з діабетом зумовлена значною поширеністю захворювання, тим що він є базою для розвитку складних супутніх захворювань та ускладнень, ранньої інвалідності та смертності. ЦД збільшує смертність в 2–3 рази, підвищує ризик розвитку ішемічної хвороби серця та інфаркту міокарда більше ніж у 2 рази, патологію нирок у 17 разів, гангрену нижніх кінцівок у 20 раз, гіпертонії – більше ніж у 3 рази [13, 34, 42, 73].

Виділяють чотири основні типи ЦД: діабет 1-го типу (внаслідок аутоімунної деструкції  $\beta$ -клітин, як правило, виникає абсолютна інсулінова недостатність), цукровий діабет 2-го типу (виникає через порушення секреції інсуліну на фоні резистентності до нього), гестаційний діабет (ЦД, що діагностується під час вагітності), а також специфічні типи діабету, пов'язані з іншими причинами, наприклад, генетичними дефектами функцій  $\beta$ -клітин або дії інсуліну, внаслідок лікарсько- або хіміко-індукованої зміни (наприклад, при лікуванні ВІЛ/СНІДу або після трансплантації органів), а також будь-якими захворюваннями підшлункової залози, що характеризуються процесом, який травмує підшлункову залозу і може викликати діабет [13, 39, 130, 138].

Виникнення цукрового діабету 1-го типу характеризується зменшенням, або повною відсутністю гормону інсуліну, причиною чого можуть слугувати різні фактори зовнішнього та внутрішнього середовища [59]. Етіологічними факторами

розвитку захворювання ЦД 1-го типу можуть бути: 1) віруси (Коксакі В, епідемічного паротиту, краснухи, вітряної віспи, кору, цитомегаловірусу, реовірусу типу III); 2) штучне харчування новонароджених сумішами, які містять коров'яче молоко (антигенами є пептид бичачого сироваткового альбуміну,  $\beta$ -лактоглобуліну,  $\beta$ -казеїну); 3) лікарські препарати та хімічні агенти (алоксан, стрептозотозин, вакор, пентимідин [74]); 4) стреси [209]. Однак точні механізми, що призводять до аутоімунного руйнування  $\beta$ -клітин при ЦД 1-го типу, досі залишаються нез'ясованими. Згідно сучасних уявлень про патогенез захворювання, загибель  $\beta$ -клітин може проходити в результаті різних патологічних процесів: некрозу та/або апоптозу [72, 124].

Початкову фазу розвитку ЦД називають латентним або доклінічним періодом хвороби. Ці етапи захворювання можуть протікати безсимптомно, проте деструкція  $\beta$ -клітин уже може бути виявлена за появою аутоантитіл. Коли гине 80–95 %  $\beta$ -клітин й інсулінова недостатність стає близькою до абсолютної, розвиваються важкі метаболічні порушення та настає клінічний період хвороби [21, 34].

Генетична схильність до ЦД реалізується завдяки несприятливій комбінації нормальних генів, більшість з яких кодують різні стадії аутоімунного процесу. На даний час виділено ряд локусів на різних хромосомах, поліморфні алелі яких позитивно чи негативно асоціюються з ЦД 1-го типу. Локуси, що визначають схильність до діабету, розташовані на різних хромосомах. На найбільшу увагу заслуговують 6 та 2 хромосоми, оскільки на них ідентифіковано 7 з 22 відомих на сьогоднішній день локусів, які визначають розвиток захворювання.

Найперспективнішою ділянкою генома людини таких генетичних маркерів є головний комплекс гістосумісності – локус HLA, що розміщений на короткому плечі 6-ї хромосоми. Гени цієї ділянки визначають швидкість відторгнення тканинного трансплантату. Також система HLA виконує в організмі й ряд інших важливих функцій, зокрема здійснює генетичний контроль імунної відповіді та підтримання нормального гомеостазу [154]. Дві комбінації генів HLA (або гаплотипів) мають особливе значення у патогенезі розвитку діабету: DR4-DQ8 і DR3-DQ2, присутні в 90 % людей з ЦД 1-го типу [68].

### 1.1.1. Патофізіологічні механізми розвитку ЦД 1-го типу

Центральний механізм розвитку ЦД 1-го типу полягає в аутоімунному руйнуванні  $\beta$ -клітин підшлункової залози, у відповідь на яке, плазматичні клітини секретують аутоантитіла до різних антигенів  $\beta$ -клітин, які не беруть безпосередньої участі в аутоімунній реакції, але свідчать про наявність аутоімунного процесу. Ці аутоантитіла відносяться до класу імуноглобулінів G і розглядаються як імунологічні маркери аутоімунного ушкодження  $\beta$ -клітин [17, 22, 154].

Найбільш популярною теорією патогенезу ЦД 1-го типу є теорія, запропонована в 1986 р. Г. Ейзенбартом [72]. Згідно з його концепцією, в осіб з генетичною схильністю через певний час після впливу зовнішніх чинників індукується аутоімунна реакція проти  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса, виникає клітинно-кероване руйнування цих клітин, що характеризується появою клонів аутореактивних Т-лімфоцитів із подальшим руйнуванням острівцевих клітин. Запускається каскад біохімічних реакцій за участю цитокінів, макрофагів із синтезом окису нітрогену та вільних радикалів [119].

Згідно з цією теорією, виділяють шість стадій у розвитку ЦД 1-го типу:

- перша – визначається генетичною схильністю і проявляється лише у половини генетично ідентичних близнюків і в 2 – 5 % сибсів;
- друга – зумовлена дією факторів навколишнього середовища (вірусна інфекція, стрес, переїдання, хімічні фактори);
- третя – розвиток імунологічних порушень на фоні нормальної секреції інсуліну. З'являються імунологічні маркери ЦД 1-го типу – аутоантитіла до антигенів  $\beta$ -клітин (ICA), глютамат-декарбоксилази (GAD) та інсуліну (IAA);
- четверта – характеризується вираженими імунологічними порушеннями, зниженням секреції інсуліну, рівень глікемії при цьому залишається в нормі;
- п'ята – розвивається після загибелі 80–90 % усієї маси  $\beta$ -клітин;
- шоста – це абсолютна деструкція  $\beta$ -клітин.

Збільшення рівня глюкози і вільних жирних кислоти в плазмі крові, сприяє збільшенню рівня активних форм кисню (АФО), що в свою чергу активує шляхи сигналювання процесів запалення, таких як мітоген-активованої протеїнкінази і ядерного фактора- $\kappa$ B [126, 153, 197].

Важлива роль в ініціації імунних реакцій, що призводять до деструкції  $\beta$ -клітин, належить макрофагам. Активація цих клітин за участю ФНП і ІФН- $\gamma$  супроводжується утворенням великої кількості NO та цитокінів. NO, що утворюється макрофагами, функціонує як специфічна ефекторна молекула, але також може брати участь у деструкції  $\beta$ -клітин. Основна ушкоджуюча дія належить NO, який утворюється безпосередньо в острівцевих клітинах за участю iNOS. Вільні радикали кисню, оксиду нітрогену, гідроксильні радикали викликають деструкцію  $\beta$ -клітин та денатурацію білків. У результаті чого відбувається загибель цих клітин, а денатуровані білки набувають антигенних властивостей. Вважається, що природною особливістю  $\beta$ -клітин є їхня вразливість до дії вільних радикалів і слабкість системи ферментативного антиоксидантного захисту [162].

Недостатня кількість інсуліну при ЦД 1-го типу зумовлює порушення всіх ланок обміну речовин, що призводить до численних ушкоджень і дисфункції органів. Відомо, що у м'язовій і жировій тканинах транспорт глюкози здійснюється транспортером ГЛЮТ 4 за інсулінозалежним механізмом. При інсуліновій недостатності у клітинах виникає енергетичний дефіцит, тим часом як глюкоза накопичується в міжклітинному просторі. Окрім того, в умовах недостатності інсуліну посилюються глікогеноліз і глюконеогенез, що призводить до наростання глікемії [156, 214].

Теорія розвитку діабетичних ушкоджень, що виникають внаслідок тривалого впливу глюкозотоксичності полягає у тому, що посилення утилізації глюкози шляхом гліколізу та у циклі Кребса призводить до інтенсифікації роботи електронтранспортного ланцюга мітохондрій та надмірного утворення радикалу супероксид-аніону ( $O_2^{\cdot-}$ ). За умов гіперглікемії мітохондріальна супероксиддисмутаза (СОД) не справляється з надходженням великої кількості



$O_2^{\cdot -}$ , у результаті чого розвивається оксидативний стрес. При взаємодії  $O_2^{\cdot -}$  з NO утворюється цитотоксична сполука – пероксинітрит ( $ONOO^-$ ), який може взаємодіяти з рядом молекул у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції. Так у клітині виникає оксидативно-нітративний стрес, що супроводжується інтенсифікацією процесів нітрування протеїнів, перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), виникненням розривів ДНК та змінами у клітинному сигналюванні [13].

Одним із основних шляхів, залучених у патогенез діабетичних ускладнень, є посилення процесів неензиматичного глікозилювання протеїнів, внаслідок чого утворюються кінцеві продукти глікації – AGEs (від англ. Advanced Glycation End Products). Вони можуть накопичуватись як усередині клітини, так і поза нею. При взаємодії AGEs із відповідними рецепторами – RAGEs (від англ. Receptor for AGEs), які виявлено в ендотеліальних клітинах, моноцитах, макрофагах, відбувається активація цілого каскаду сигнальних механізмів, що призводить до утворення та виділення ряду прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1, ІЛ-6), вазоконстрикторів, молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1) та ростових факторів, що порушують функцію судин і сприяють розвитку запального процесу та атеросклерозу [13, 180].

### **1.1.2. Ускладнення цукрового діабету**

Поряд з гіперглікемією (зниженням утилізації глюкози, внаслідок нестачі секреції інсуліну або зниження його біологічної дії в тканинах-мішенях) при ЦД виявляють і інші обмінні порушення: гіперліпемія, гіперлактацидемія, гіперкетонемія. Гіперліпемія обумовлена підвищеним ліполізом, під впливом гормонів (катехоламіни, глюкагон і ін.) і проявляється збільшенням вмісту холестерину, фосфоліпідів, неестерифікованих жирних кислот, тригліцеридів і ліпопротеїдів. Гіперлактацидемія пов'язана з надмірним надходженням лактату з скелетних м'язів, нирок, легень, що призводить до зміни співвідношення піруват/лактат. Печінка при діабеті не в змозі утилізувати, тобто перетворити в глікоген, таку підвищену кількість лактату, що і призводить до збільшення його

рівня в крові. Підвищений ліполіз і збільшене надходження ліпідів в печінку, де вони посилено окиснюються, призводять до збільшення утворення кетонових тіл і гіперкетонемії. Утворений в процесі окиснення жирних кислот ацетил-КоА при нестачі інсуліну менше окиснюється і перетворюється в ацетоацетил-КоА, а потім в  $\beta$ -гідроксибутират і ацетон, створюючи стан, що називається – діабетичним кетоацидозом [19].

Гіперглікемія – одна з основних причин біохімічних порушень, що лежать в основі змін судинної стінки, а саме підвищує її проникність, дозволяючи білкам плазми виходити в екстравасальний простір [139].

Підвищений рівень глюкози є причиною глікозилювання білків і накопичення кінцевих продуктів глікації (AGEs), які є первинним ініціюючим моментом, що запускає каскад послідовних реакцій в стінці судин і призводить до морфологічних і структурних змін [103]. При взаємодії з рецепторами ендотеліальних клітин AGEs сприяють підвищеному синтезу в них ендотеліну-1, який є потужним фактором розвитку тромбозу. При цьому в ендотеліальних клітинах знижується синтез простагліцину. Поряд з цим під впливом накопичення AGEs в тромбоцитах збільшується синтез тромбоксану. Змінюється співвідношення простагліцину і тромбоксанів у бік збільшення останніх, що також є додатковою причиною порушення мікроциркуляції, підвищеного тромбоутворення і як наслідок розвивається так званий синдром дифузного внутрішньосудинного зсідання [14, 95].

Крім цього, додатковим компонентом, який бере участь в патогенезі судинних змін (особливо в великих судинах) при ЦД, є порушення ліпідного обміну. Останнім часом замість терміну гіперліпідемія, при ЦД, запропонований термін дисліпідемія. Підвищення рівня холестеролу, ліпопротеїдів низької, дуже низької і середньої щільності, тригліцеридів, порушення обміну аполіпопротеїнів, порушення перекисного окислення ліпідів і надмірне утворення високотоксичних гідропероксидів, вільних радикалів також сприяють значним змінам, що відбуваються в судинній стінці [1, 213].

## **1.2. Структура та функціональні властивості лейкоцитів у нормі та за умов ЦД 1-го типу**

### **1.2.1. Загальна характеристика та функції лейкоцитів**

Провідну роль у формуванні імунітету відіграють клітини крові – лейкоцити, які походять від гемопоетичних стовбурових клітин (клітини-попередники) кісткового мозку і в залежності від цього поділяються на 2 лінії: лімфоїдну (Т- та В-лімфоцити) і мієлоїдну (нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, моноцити, макрофаги) [111].

Лейкоцити поділяють на гранулоцити та агранулоцити. Для всіх без винятку гранулоцитів характерна висока лабільність клітинної поверхні, що зумовлено низьким поверхневим від'ємним зарядом, що полегшує утворення псевдоподій, без чого неможливий фагоцитоз. Гранулоцити становлять 50–70 % усіх лейкоцитів крові. До них належать нейтрофіли, еозинофіли та базофіли. Основна функція нейтрофільних гранулоцитів полягає у фагоцитозі бактерій, із наступною дією на них своїми лізосомальними ферментами (протеазами, пептидазами, оксидазами, дезоксирибонуклеазами). Еозинофіли, в свою чергу, виявляють фагоцитарну і бактерицидну дію. Ці клітини крові зменшують концентрацію біологічно активних сполук, що виникають внаслідок розвитку алергічних реакцій, продукують фермент гістаміназу, який протидіє секреції гістаміну базофілами при різних алергічних станах, паразитарних та аутоімунних захворюваннях. Базофільні гранулоцити містять гепарин (запобігає зсіданню крові), гістамін (розширює капіляри), гіалуронову кислоту (впливає на проникність судинної стінки), фактор активації тромбоцитів, тромбосани (сприяють агрегації тромбоцитів), лейкотрієни і простагландини. Базофільні гранулоцити здатні до фагоцитозу, разом з еозинофілами беруть участь в алергічних реакціях, а також обміні гепарину та гістаміну [35]

Агранулоцити – це лімфоцити і моноцити (мононуклеарні лейкоцити). Лімфоцити – центральна ланка імунної системи. Вони формують специфічний

захист, є носіями імунної пам'яті, відповідають за вироблення і транспортування антитіл. Функціонально Т-клітинну популяцію лімфоцитів визначають як систему, що відповідає за клітинний імунітет, при якому антигени розпізнаються сенсibilізованими лімфоїдними клітинами, а не антитілами сироватки. Головна функція популяції В-лімфоцитів полягає у формуванні специфічного гуморального імунітету.

Моноцити (макрофаги) беруть участь у формуванні імунної відповіді організму, процесу запалення, посилюють регенерацію тканин, протипухлинний захист та регуляцію гемопоезу [8, 111].

### **1.2.2. Порухення функціонального стану лейкоцитів за умов цукрового діабету**

За умов діабету зміни у загальній кількості лейкоцитів, їхньому співвідношенні та функціональних властивостях є наслідком активації імунних процесів і можуть виступати причинами схильності хворих на ЦД до інфекційно-запальних процесів [104, 115].

При діагностиці порушень імунної системи за умов різних патологій досліджують стан фагоцитуючих клітин (моноцитів та нейтрофілів) [204]. Функціональний стан нейтрофілів є одним з найважливіших факторів неспецифічної резистентності організму. Нейтрофіли, що циркулюють у крові в разі розвитку в організмі стрес-синдрому, беруть участь у генералізованих каскадних гуморальних реакціях, спрямованих на підтримання відповідних реологічних властивостей крові, тому їх можна розглядати як одну із стреслімітуючих систем організму [24]. Порухення фагоцитозу у хворих на ЦД пов'язані з порушенням метаболізму ліпідів і арахідонової кислоти, дефіцитом енергетичного забезпечення клітин [20].

За умов ЦД лейкоцити характеризуються підвищеною адгезивною здатністю до ендотелію судин. До патогенетичних механізмів, які порушують адгезію білих клітин крові, належать підвищений рівень молекул клітинної адгезії на поверхні

ендотеліальних клітини, а також зміни самих лейкоцитів. Так, збільшення жорсткості мембрани та зниження здатності лейкоцитів до деформації може викликати пошкодження капілярів. Невеликий діаметр просвіту судин, посилення адгезії лейкоцитів до стінки ендотелію призводить до їхнього захоплення у капілярах (лейкостаз) і посилення судинної оклюзії, що є важливим моментом у розвитку діабетичних мікроангіопатій [45, 60].

За умов ЦД нейтрофіли є одним із основних джерел активних форм кисню (АФО) в організмі. Ймовірно, цей процес ініціюється через протеїнкіназа С-опосередковану активацію НАДФН-оксидази у відповідь на хронічну гіперглікемію, а також є результатом стимуляції ФНП- $\alpha$ . НАДФН-оксидаза є багатокомпонентним, асоційованим із мембраною ензимом, який каталізує одноелектронне відновлення кисню до супероксид-аніону з використанням НАДФН як донора електронів. Локальне вивільнення захопленими лейкоцитами АФО, зокрема  $O_2^{\cdot-}$ , може потенційно призводити до пошкодження ендотеліальних клітини та прилеглих тканин [83, 184].

### **1.2.3. Трансендотеліальна міграція лейкоцитів**

Важливою характеристикою прояву функціональної активності лейкоцитів є їхній вихід із судин (діapedез) в місце, де відбувається розвиток інфекції. У процесах міграції лейкоцитів у вогнище запалення виділяють кілька етапів:

1) Адгезія лейкоцитів до ендотелію судин, що зумовлена групою мембранних білків лейкоцитів та ендотеліальних клітин, які отримали назву молекул клітинної адгезії.

2) Трансендотеліальна міграція. Нейтрофіли і моноцити проходять через міжендотеліальні проміжки амебоподібним способом, випинаючи свої псевдоподії у простір між ендотеліоцитами. Лімфоцити здатні долати ендотелій трансцелюлярно, тобто проходити прямо через цитоплазму клітин судинної стінки, не ушкоджуючи їх. Проходження лейкоцитів крізь базальну мембрану пов'язують з двома механізмами. Перший з них ґрунтується на явищі тиксотропії:

при контакті лейкоцитів з базальною мембраною її колоїди переходять зі стану гелю в стан золь (мембрана розріджується). Лейкоцит легко проходить через золь, "чіпляючись" своїми інтегриновими молекулами за сполучнотканинні елементи (фібронектин, ламінін, колаген), після цього золь знову перетворюється у щільний гель. Другий механізм полягає у вивільненні лейкоцитами нейтральних протеаз (колагенази, еластази, желатинази) – ферментів, що здійснюють розщеплення структурних компонентів базальної мембрани [69].

3) Хемотаксис. Після проходження через судинну стінку лейкоцити рухаються у тканині до епіцентру запалення, що відбувається під впливом хемоатрактантів [125].

4) Здійснення захисних функцій лейкоцитів у вогнищі запалення. Цей етап міграції є завершальним, саме він визначає дальший перебіг запального процесу. Здійснення міграції лейкоцитів відбувається за участю трьох типів молекул клітинної адгезії: селектинів, інтегринів, білків сімейства імуноглобулінів (рис. 1.1).

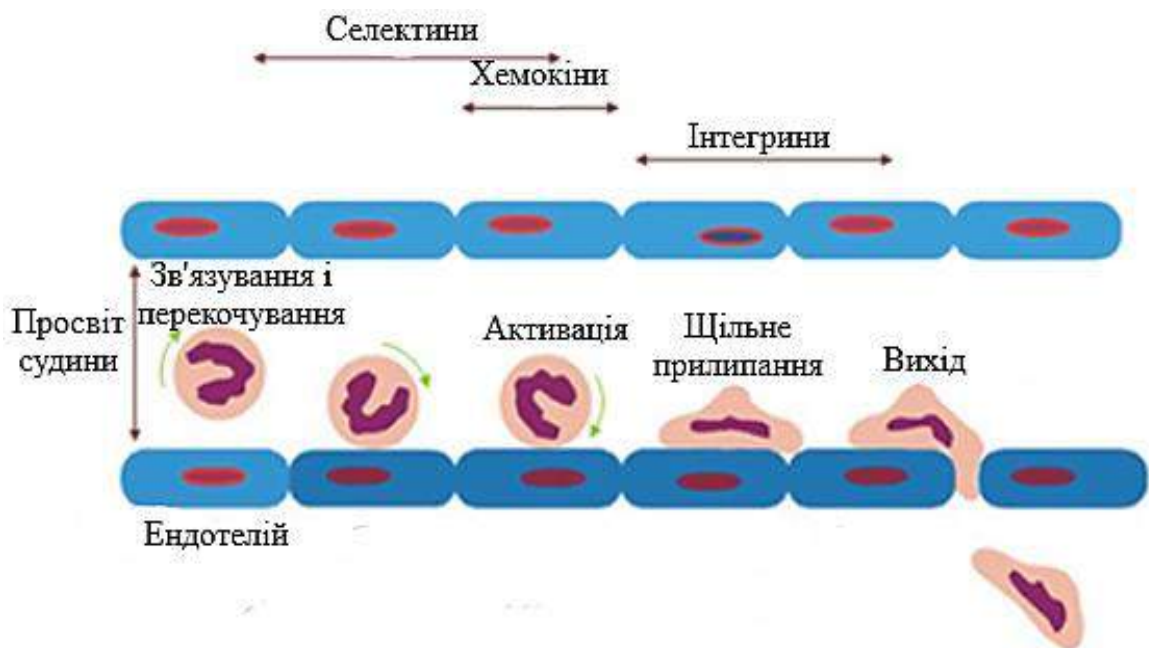


Рис. 1.1. Міграція лейкоцитів за участю молекул адгезії.

Селектини (L-, P-, E-селектини) є трансмембранними білками. Вони специфічно зв'язують олігосахариди, що входять до складу багатьох поверхневих

глікопротеїнових молекул. Із селектинами пов'язана рання, оборотна адгезія лейкоцитів, яка завершує власне маргінацію (значне уповільнення руху лейкоцитів та їхню зупинку) і започатковує остаточне прилипання, зумовлене двома іншими сімействами адгезивних білків.

Інтегрини – це трансмембранні білки, молекули яких складаються з двох ланцюгів –  $\alpha$  і  $\beta$ .  $\alpha$ -Ланцюг має однакову структуру у всіх інтегринів, а будова  $\beta$ -ланцюга різна і зумовлює існування великої кількості підвидів цих молекул. Для здійснення адгезії лейкоцитів найбільше значення мають лейкоцитарні інтегрини (LFA-1, p150, MO-1), які взаємодіють з відповідними імуноглобуліноподібними молекулами ендотеліальних клітин.

Білки сімейства імуноглобулінів, що містяться на поверхні ендотеліоцитів (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1), беруть участь у здійсненні адгезії лейкоцитів, специфічно зв'язуючись з відповідними інтегринами клітин [75].

Черговість експресії молекул адгезії на поверхні епітеліальних клітин впливає на фази міграції лейкоцитів у вогнище запалення. Так, рання експресія E-селектинів на поверхні ендотеліальних клітин забезпечує адгезію до них нейтрофілів. Для лімфоцитів та макрофагів, які другими за чергою з'являються в зоні запалення, важливу роль відіграє експресія на їхній поверхні молекул  $\beta$ 2-інтегринів (LFA-1, CR3), які зв'язуються з ендотеліальними адгезинами ICAM-1 і ICAM-2. Такий механізм забезпечує чітку черговість міграції лейкоцитів через ендотелій судин та поетапну появу різних клітин у вогнищі запалення [197].

Лейкоцити, які вийшли з кровотоку втрачають молекули адгезії та експресують нові молекули – рецептори для хемотактичних факторів. У міжклітинному матриксі переміщенню лейкоцитів сприяють адгезивні молекули з групи  $\beta$ 2-інтегринів, які отримали назву «дуже пізні» інтегрини (VLA - very late antigen). Ця група адгезинів включає молекули для взаємодії з колагеном (VLA-2 і VLA-3), ламініном (VLA-3 і VLA-6), фібронектином (VLA-3, VLA-4 і VLA-5) тощо. Тобто, названі структури служать рецепторами до того субстрату, з яким лейкоцити будуть взаємодіяти в процесі руху в міжклітинному середовищі. Скерованість руху лейкоцитів визначається поступовим зростанням концентрації

різних хемотаксичних речовин в міру наближення до вогнища запалення [62]. Роль хемоатрактантів виконують наступні речовини: 1) продукти життєдіяльності чи деструкції мікроорганізмів (ліпополісахариди, токсини, фрагменти нуклеїнових кислот); 2) N-формілметіонінові пептиди – синтезуються мікроорганізмами; 3) цитокіни (IL-1 $\beta$ ), лейкотрієн B<sub>4</sub>, cAMP, гістамін, C-реактивний білок); 4) компоненти комплементу C3a і C5a; 5) продукти розпаду імуноглобулінів; 6) ушкоджені та денатуровані білки; 7) ферменти білків системи зсідання крові (тромбін, фібрин); 8) хемокіни – активні хемоатрактанти, які відносяться до цитокінів ( $\alpha$ - і  $\beta$ -хемокіни, відрізняються різним розміщенням залишків цистеїну біля N-кінця молекули). На мембранах мігруючих лейкоцитів експресуються рецептори для хемоатрактантів, при взаємодії яких з відповідними лігандами клітина отримує активаційні сигнали для скерованого руху [63].

Хемоатрактанти зв'язуються зі специфічними рецепторами клітинної поверхні і, в основному, активують G-білки в лейкоцитах. [89, 110, 158]. Клітини використовують різні рецептори, щоб розпізнавати хемоатрактанти. Спільною рисою хемотаксичних рецепторів є використання малих G-білків суперсімейства Ras і PI-3'-кінази для підвищення рівня фосфоінозитолтрифосфату (ФІФ<sub>3</sub>) на лідерному кінці клітини [69, 157].

Активація PI-3'-кінази G-білками призводить до збільшення продукування сигнальних ліпідів фосфоінозитолтрифосфату (ФІФ<sub>3</sub>) і фосфоінозитолдифосфату (ФІФ<sub>2</sub>). Встановлено, що лейкоцити належать до клітин, які мають найвищий стимул-залежний рівень продукції цих ліпідів. Для лейкоцитів характерна наявність кількох ізоформ PI-3'-кіназ –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  і  $\delta$  [35, 44, 205]. Центральне місце серед ефекторів PI-3'-кінази займають мітоген-активовані сигнальні білки (протеїнкіназа C, фосфоінозитолзалежні кінази, малі G-білки, MAP-кінази), що активуються або при взаємодії з ліпідними продуктами реакції PI-3'-кінази, або через PI-3'-кіназа-залежне фосфорилування білків [48, 163, 191].

У перші години у зоні запалення переважають нейтрофіли, потім – протягом наступних 24–48 год – основним клітинним компонентом інфільтрату стають



моноцити. Тільки через кілька діб від початку запалення у тканину мігрує значна кількість лімфоцитів [89, 200].

Таку послідовність міграції лейкоцитів можна пояснити різним часом появи на поверхні лейкоцитів та ендотелію молекул клітинної адгезії, а також різною динамікою змін концентрації речовин-хемоатрактантів, що вибірно стимулюють хемотаксис різних видів лейкоцитів [125].

### **1.3. Реорганізація актинового цитоскелету лейкоцитів як основа руху клітини**

Реорганізація актинового цитоскелету у результаті полімеризації-деполімеризації актину має важливе значення для здійснення локомоторних функцій лейкоцитів і є ключовим моментом у забезпеченні їхньої міграційної здатності [158, 230]. Найважливішими функціональними змінами лейкоцитів за умов ЦД 1-го типу, які викликають ангіопатії, є підвищення проникності судинної стінки, гемодинамічні розлади, зміни в'язкості крові і дисфункція адгезивної, агрегаційної і міграційної здатності лейкоцитів [216].

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 [38, 77]. Під час руху клітини полімеризація актину та формування ламелоподії відбувається дуже швидко – до 1 мкм/с. За таких умов сотні субодиноць актину за секунду видаляються від актинових філаментів на відстаючому кінці і приєднуються на лідерному (ростучому, від'ємно зарядженому) кінці. Формування пучків актинових філаментів діаметром 0,1-0,2 мкм і довжиною декілька мікрометрів призводять до утворення на мембрані виступів, ініціюючи переміщення лейкоцитів [77, 185].

### 1.3.1. Молекулярні механізми процесу полімеризації актинових філаментів лейкоцитів

Актин присутній у клітині як у формі мономерного білка з молекулярною масою 42 кД, так і у вигляді довгих ниток і їх пучків, які зв'язані з іншими елементами цитоскелету та мембранами органел. Мономери актину мають грушеподібну форму і при їх полімеризації виникає спіральна закручена поляризована нитка з «гострим» (мінус) і «тупим» (плюс) кінцем [181].

Утворення мембранних псевдоподій на передньому кінці клітини є першим етапом руху лейкоцитів і відбувається за участі АТФ-залежної полімеризації-деполімеризації актинових філаментів. Зв'язані з АТФ мономери актину приєднуються до так званих «тупих» кінців філаментів, що розташовані ближче до мембрани [199]. Полімеризація актину відбувається на «тупому» (плюс) кінці філамента, а деполімеризація – з боку «гострого» (мінус) кінця. Будівельним матеріалом, що використовується для видовження актинової нитки, є мономери актину, що містять в своєму складі молекулу АТФ. Після вбудовування в мікрофіламенти мономери актину набувають здатності гідролізувати АТФ до АДФ і неорганічного фосфату. Таким чином, мономери актину, розташовані в різних ділянках актинової нитки, містять в своєму складі або АТФ, або АДФ і неорганічний фосфат, або тільки АДФ. Міцність контакту сусідніх мономерів актину залежить від того, який нуклеотид знаходиться в активному центрі актину. Мономери актину, які містять в своєму складі АТФ, міцніше взаємодіють один з одним, ніж ті, що містять в своєму складі АДФ (рис. 1.2) [12].

Особлива група білків, що отримала назву факторів деполімеризації актину (ФДА або ADF, actin depolymerizing factors), а також білок кофілін здатні взаємодіяти з тією частиною актинового філамента, яка містить мономери актину, насичені АДФ. Зв'язування ФДА або кофіліну з мономером актину в складі мікрофіламента супроводжується невеликим поворотом мономерів актину один щодо одного [181]. При цьому послаблюються контакти двох сусідніх мономерів і зростає ймовірність розриву актинового філамента або дисоціації мономера

актину з «гострого» кінця актинового філамента. Дисоційовані з «гострого» кінця мономери містять в своєму складі АДФ і не здатні вступати в реакцію полімеризації до тих пір, поки не обмінюють АДФ на АТФ. Кофілін і фактори деполімеризації актину перешкоджають обміну АДФ на АТФ. Після дисоціації комплексу актин-кофілін та актин-ФДА, що здійснюється за участю спеціальних протеїнкіназ, в клітині накопичуються мономери актину, що містять АДФ, які взаємодіють з профіліном (низькомолекулярний білок), що прискорює процес обміну АДФ на АТФ. Внаслідок всіх цих реакцій в клітині накопичується комплекс АТФ-актин-профілін, після дисоціації якого мономерний актин, що містить в своєму складі АТФ, вступає в реакцію полімеризації і набуває здатності вбудовуватися в мікрофіламенти з боку «тупого» (плюс) кінця (рис. 1.2) [12].

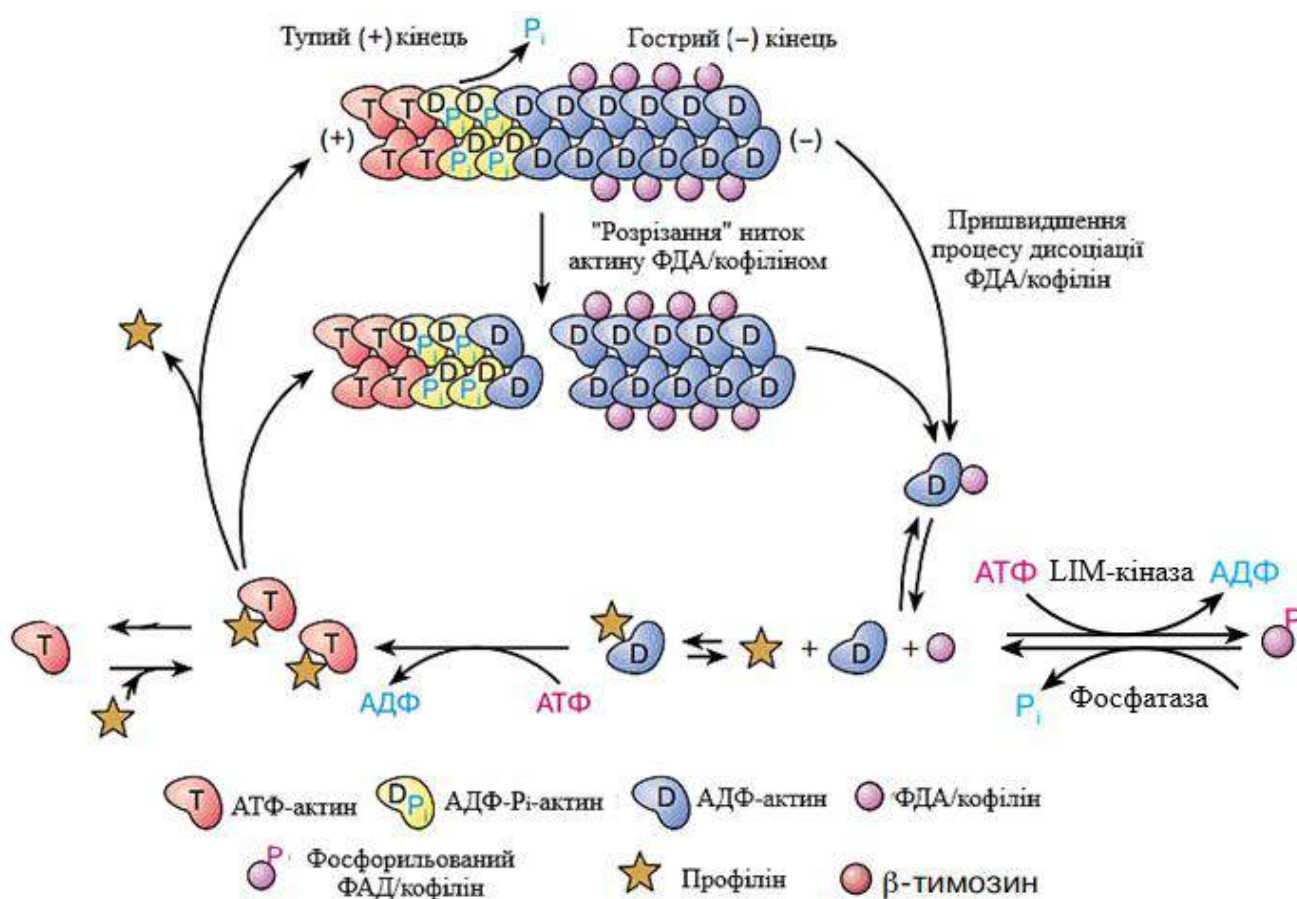


Рис 1.2. Динаміка формування ниток актину у клітині.

Актинові філаменти є дуже динамічною структурою. На одному кінці актинового філамента відбувається процес полімеризації, а на іншому кінці нитки процес деполімеризації актину. Швидкість полімеризації і активність псевдоподій залежать від доступності і локальної концентрації мономерного актину, кількості і активності його регуляторів [12].

Відомі три основні групи цитоплазматичних білків, які підтримують пул актинових мономерів [148]. Профілін – прискорює елонгацію і активує нуклеацію ниток актину. Кофілін прискорює деполімеризацію актину з «гострих» кінців і може розрізати філаменти (рис 1.2).  $\beta$ -тимозин є постачальником мономерного актину.

В активному стані кофілін, зв'язуючись з актиновими мікрофіламенами, сприяє їхньому руйнуванню. При цьому зменшується кількість стрес-фібрил, які відповідальні за підтягування заднього краю клітини при русі. З іншого боку, при руйнуванні актинових мікрофіламентів відбувається збільшення вільних кінців актину, що призводить до інтенсивнішого випинання переднього краю клітини, що мігрує [172].

Фосфорилування під дією LIM-кінази (LIMK) призводить до інактивації кофіліну. Фосфатази відщеплюють від молекули білка залишок фосфату (P) і переводять його знову в активний стан [189].

Вільні від'ємно заряджені кінці актинових філаментів, на яких відбувається подовження ниток актину, виникають декількома способами: видаленням кеп-білків, які у приєднаному стані на ростучих кінцях актину блокують процес полімеризації; деполімеризацією фрагментів актину, які утворюються внаслідок роз'єднання нековалентних зв'язків між мономерами актину в межах актинових філаментів, що призводить до утворення коротших ниток з вільними від'ємно зарядженими кінцями; утворенням *de novo* олігомерів актину [188].

Наростаючий філамент впирається в клітинну мембрану та постійно флуктує і періодично утворюється проміжок між мембраною і кінцем філамента. Коли цей проміжок дозволяє, в нього вбудовується новий мономер актину і, не даючи мембрані повернутися на колишнє місце, рухає її вперед. Ця

модель поєднує рух мембрани з полімеризацією актину, і узгоджується з більшістю експериментальних досліджень [172].

Динамічні актинові філаменти утворюють суцільну мережу, яка регулюється актин-зв'язувальними білками. В результаті їхньої дії на периферії клітини з'являються різні за формою та структурою виступи. Ламела на периферії переходить в ламелоподію, яка є тоншою. Погано закріплена ламелоподія формує мембранні складки (або рафли від англ. ruffles), що не прикріплюються до субстрату. Наявність рафл на поверхні мембан клітин свідчить про преактивованій стан лейкоцитів [37].

Філаменти актину ламелоподій мають здатність латерально взаємодіяти між собою з утворенням пальцеподібних виростів – мікрошипів і філоподій. Ламелоподії містять дуже щільну розгалужену сітку актину. У ламелоподіях актинові філаменти, головню, орієнтовані з гострих кінців (позитивно заряджених) до краю клітини, а полімеризація актину генерує силу, яка штовхає мембрану вперед, створюючи передумови для нових адгезивних контактів лейкоцита за участю філоподій з ендотелієм [54].

Філоподії утворюються зі щільно укомплектованих паралельних ниток актину (10 або більше), гострі кінці яких спрямовані в бік мембрани. Групування ниток актину опосередковується білком-зшивачем – фасцином. Поляризований характер ниток актину дає змогу руховим білкам активно транспортувати мономери актину до кінців філоподій, посилюючи локальну полімеризацію актину [40, 54].

У разі дії стимулювальних чинників лейкоцити активуються, внаслідок чого відбувається швидка полімеризація актинових філаментів із наявних у клітині мономерів G-актину [57]. Димери і тримери актину не є стійкими, і тому, щоб формування нових актинових філаментів продовжувалося, до них приєднуються фактори ініціації утворення ядер нових актинових ниток. Також для швидкої полімеризації актину мають бути наявні вільні від'ємно заряджені кінці актинових філаментів. Формування стабільних адгезивних структур внаслідок полімеризації актину, призводить до утворення кометоподібних актинових хвостів, які асоціюються з інтегринами на передньому кінці лейкоцита й

індукують кластеризування  $\beta 1$ -інтегринів, внаслідок чого на поверхні клітини формуються актинові складки в ділянці ламеллоподій і філоподій [56, 85].

Форма, розмір і загальна швидкість утворення псевдоподій залежать від кількості вільних «тупих» кінців актину та швидкості його полімеризації. Кількість філаментів зростає, в основному, завдяки нуклеації та утворення філаментів *de novo* і, меншою мірою, завдяки розрізанню існуючих філаментів. Нуклеація є термодинамічно не вигідною для клітини. Для її прискорення та регуляції клітина використовує спеціальні білки: формін, Spire та Arp 2/3. Оскільки форміни виконують також кепуючу функцію, а Arp 2/3 – забезпечує галуження, ці білки слугують головними регуляторами динаміки актину при русі клітин [54].

Характерною ознакою формінів є наявність двох доменів (англ. Formin Homology domain) – FH1 та FH2. Безпосередню участь у нуклеації бере домен FH2, і його достатньо для цього процесу. Форміни активні як гомодимери, у складі яких їхні FH2 домени утворюють кільце, що охоплює дві молекули актину. Така конформація білка називається «закритою» і вона перешкоджає додаванню нових субодиниць до мікрофіламенту. Проте формін може переходити у «відкриту» конформацію, яка сприяє полімеризації «тупого» кінця нитки актину (рис 1.3).

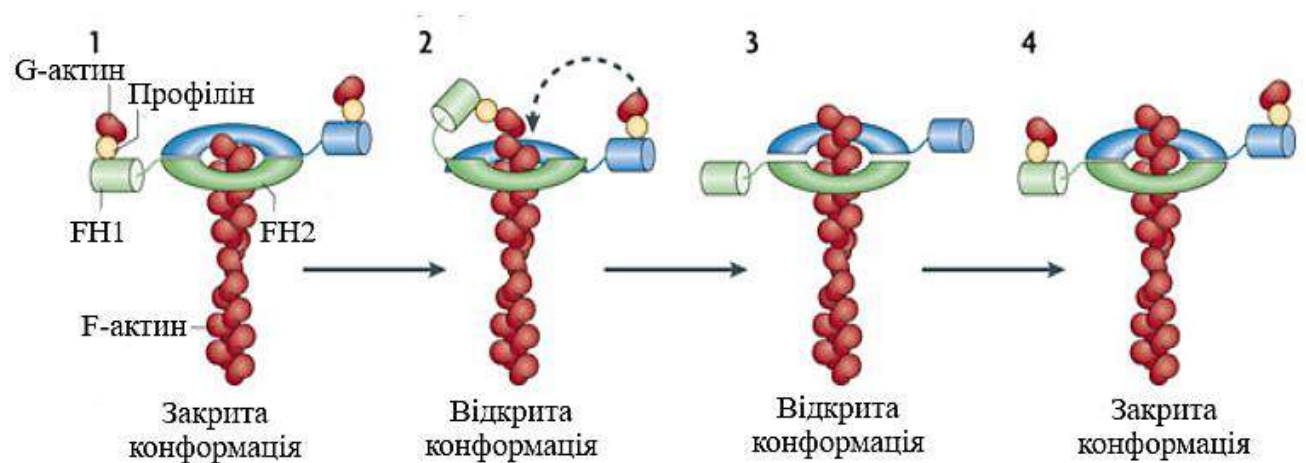


Рис. 1.3. Полімеризація актину за участю форміну.

FN1 домен є необхідним для процесу нуклеації за участю формінів, оскільки пришвидшує цей процес, як і полімеризацію. Він містить багаті на пролін послідовності, які забезпечують зв'язування із профіліном – білком доставки мономерного актину.

Ще одним класом білків, що забезпечують нуклеацію мікрофіламентів – родину WH2 нуклеаторів, характерною ознакою яких є наявність кількох доменів WH2 (англ. WASP Homology 2). Одним із найкраще вивчених білків цієї родини є Spire ссавців. Білок Spire містить чотири домени WH2, кожен з яких може взаємодіяти із мономерним актином і, таким чином, забезпечувати нуклеацію, утворюючи і стабілізуючи ядро із чотирьох мономерів. Ці білки активуються фосфатидінозитолтрисфосфатом (ФІФ<sub>3</sub>).

На відміну від форміну і Spire, які беруть участь у нуклеації лінійних філаментів актину, Agr 2/3 забезпечує розгалуження актинових філаментів під кутом 70°. Він складається із семи субодиниць, за двома із яких – Agr 2 та Agr 3, ця структура і отримала свою назву (рис. 1.4). Білки Agr 2 та Agr 3 приблизно на 45 % ідентичні актину. Решта п'ять субодиниць називаються Agrс 1-5. Механізм дії комплексу Agr 2/3 полягає у тому, що білки Agr 2 та Agr 3 імітують димер актину, і після приєднання ще однієї молекули актину стають ядром полімеризації [98].

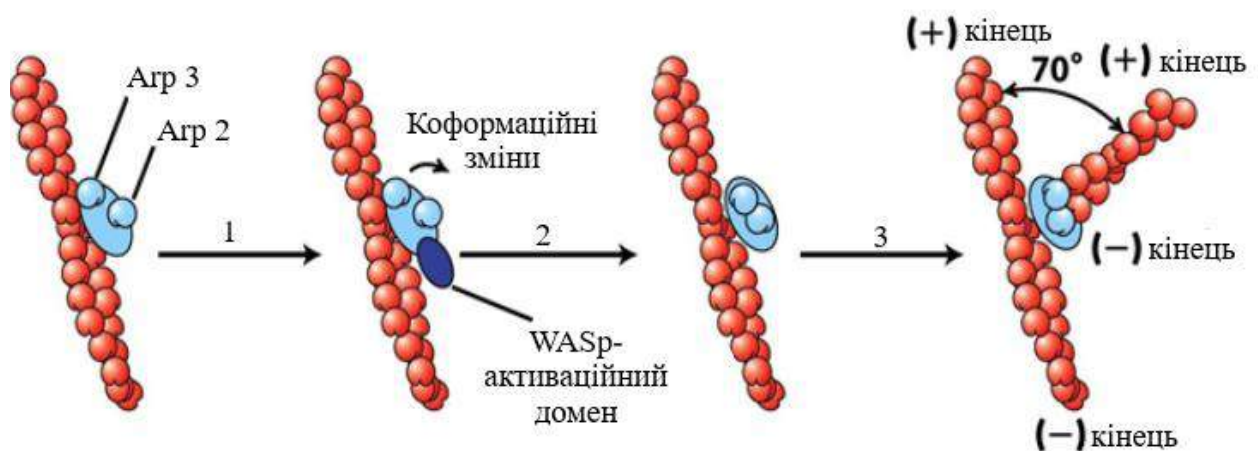


Рис. 1.4. Полімеризація актину за участю комплексу Agr 2/3.

Arp 2/3 комплекс спочатку неактивний і активується при зв'язуванні з білками WASP або Scar (suppressor of cAMP receptor)/WAVE (WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family verprolin homology protein), які передають сигнал від хемотактичних рецепторів. У свою чергу, вони регулюються білками, які сприймають і передають інформацію від поверхневих рецепторів, а саме малими ГТФ-азами родини Rho: Rac і Cdc42 регулюють, відповідно, ламеллоподії і філоподії, а Rho-білок – утворення стрес-фібрил і міозин-залежну скоротливість [199].

У разі рецептор-залежної активації Arp 2/3 беруть участь WASP, Scar/WAVE, кортактин та інші регулятори актину. Активація WASP відбувається при зв'язуванні Cdc42 і ФІФ<sub>2</sub> на плазматичній мембрані завдяки припинення автоінгібування і переходу у відкриту конформацію (рис. 1.5). В активації WASP беруть участь й інші сигнальні білки, усі вони містять SH3-домени і зв'язуються з пролін-багатими послідовностями WASP [183, 219].

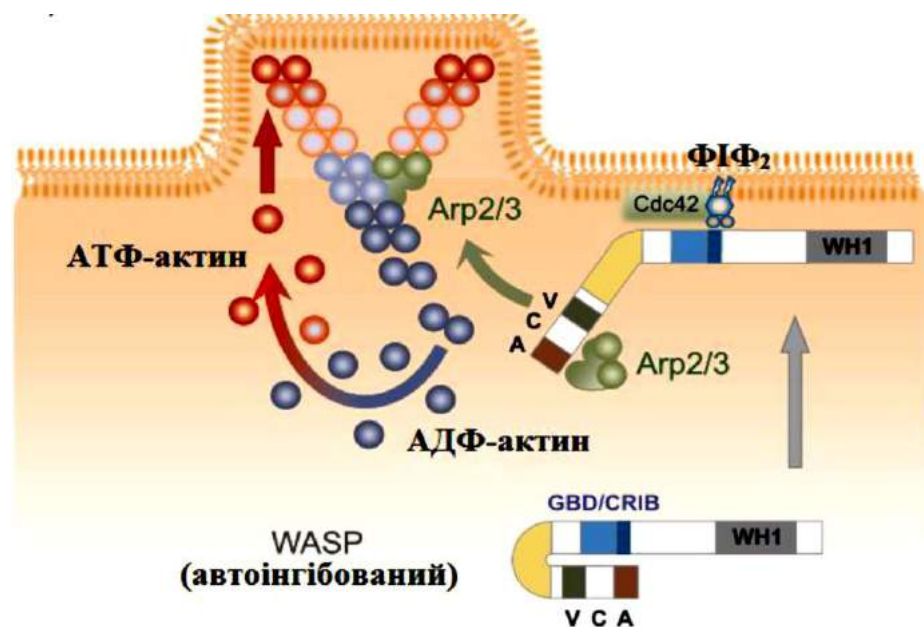


Рис. 1.5. Структура і полімеризація актину на передньому краї клітинних виростів. Схема активації актину за дії WASP (Wiskott-Aldrich syndrome family



protein), Arp 2/3 (Actin-Related Proteins, Arp 2/3 complex), Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) і ФІФ<sub>2</sub> (фосфатидилінозитолбіфосфат) [5].

Крім WASP, полімеризацію актину регулюють білки WAVE/Scar. На відміну від WASP, вони не піддаються автоінгібуванню і активуються у складі білкового комплексу. Їхнім основним регулятором також є мала ГТФ-аза Rac [193]. Білки сімейства WAVE/Scar містять характерний домен гомології WAVE/Scar (WHD), а також VCA домен, який забезпечує цим факторам здатність активувати Arp 2 / 3 та ініціювати відгалуження актину [172].

Отже, переміщення лейкоцитів є динамічним, багатоетапним, каскадним процесом, який потребує активації різноманітних адгезивних молекул і сигнальних шляхів, а також перебудови актинового цитоскелету [188, 218].

#### **1.4. Виникнення оксидативного, нітративного та карбонільного стресів за умов ЕЦД**

Серед окисно-відновних реакцій, що відбуваються при ЦД, особливу роль відіграють вільно-радикальні реакції, при яких в результаті метаболічних процесів утворюються пероксидні сполуки. Ініціаторами утворення таких сполук зазвичай є вільні радикали, молекули чи фрагменти молекул, які мають в одному із атомів кисню неспарений електрон. Активні форми кисню найчастіше представлені супероксидним ( $O_2^{\cdot-}$ ) і гідрооксипероксидним ( $HO_2^{\cdot-}$ ) радикалами, які вступають у взаємодію між собою з утворенням перексиду водню і можуть безпосередньо окиснювати органічні молекули (жирні кислоти, ділянки білкових комплексів) [101, 150].

Активація процесів вільнорадикального окиснення є однією з важливих ланок розвитку ЦД. Основними джерелами АФО у клітині є: дихальний ланцюг, неферментативне глікозилювання, НАДФ-оксидаза [76].

Патогенетична роль оксидативного стресу (ОС) пов'язана з пошкодженням ДНК, ліпідів, білків, порушенням клітинного гомеостазу і накопиченням молекул із зміненою структурою [106].

В основі розвитку ОС на фоні підвищення концентрації глюкози лежать наступні механізми:

1. Автоокиснення глюкози та її метаболічних інтермедіатів (глюкозо-6-фосфату і фруктозо-6-фосфату) з подальшим збільшенням кількості вільних радикалів й утворенням кінцевих продуктів глікації [15].

2. Обмін сорбітолу, що призводить до генерації вільних радикалів і зниження вмісту відновленого глутатіону – універсального внутрішньоклітинного антиоксиданту, нестача якого суттєво ослаблює систему антиоксидантного захисту і, таким чином, підвищує можливість пошкодження клітин унаслідок розвитку ОС.

3. Активація гексозамінового шляху. За умов гіперглікемії частина глюкози через низку проміжних продуктів, за участю ензиму глутамін-фруктозо-6-фосфатамінотрансферази перетворюється в N-ацетилглюкозамін. Приєднуючись до залишків серину та треоніну, ця сполука здатна індукувати ряд внутрішньоклітинних пошкоджень, у тому числі і на генетичному рівні. Внаслідок цього зростає експресія трансформуючого фактора росту- $\beta 1$ , інгібітора активації плазміногену-1 і фактора росту тромбоцитів, що веде до посилення гемокоагуляції і розвитку судинної дисфункції [128].

4. Порушення гліколізу сприяє накопиченню тріозофосфатів, які можуть перетворюватися в  $\alpha$ -гліцерофосфат – попередник диацилгліцеролу, який є активатором класичних ізоформ ферменту протеїнкінази C ( $-\beta$ ,  $-\delta$ ,  $-\alpha$ ). На тлі підвищеної активності протеїнкінази C збільшується синтез фактора росту тромбоцитів (ТРФ  $\beta$ ), фібронектину, інгібітора активатора плазміногену-1, що призводить до зростання коагуляційного потенціалу крові та зростання ризику тромботичних ускладнень. Крім того, накопичення тріозофосфатів призводить до утворення карбонільних сполук, що беруть участь в окисній модифікації білків, ліпідів і ДНК [129].

5. Активація окисного фосфорилування з інтенсифікацією функцій електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Мембранний потенціал зростає до критичної межі і електрон із коензиму Q починає передаватися молекулі кисню

з утворенням радикалу супероксид-аніону ( $O_2^{\cdot-}$ ). За умов гіперглікемії мітохондріальна супероксиддисмутаза (MnСОД) не справляється з надходженням великої кількості супероксид-аніону, у результаті чого розвивається ОС [53].

6. Глікозилювання протеїнів. Продукти аутоокиснення глюкози запускають процес неферментативного глікозилювання білків. Приєднання глюкози до молекули протеїну веде до структурної модифікації останнього з утворенням кінцевих продуктів неензиматичного глікозилювання. Кінцеві продукти глікації (AGEs) здатні порушувати трансдукцію сигналу, клітинно-клітинну взаємодію, внаслідок чого порушується функціональний стан клітин (зокрема, клітин ендотелію) [146].

У результаті гіперглікемії посилюється утворення вільних радикалів, насамперед супероксид-аніону, який, взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на гідроксил-радикал, пероксид водню та пероксинітрит ( $ONOO^-$ ). Утворення останнього відбувається при взаємодії  $O_2^{\cdot-}$  з оксидом нітрогену. Пероксинітрит безпосередньо або опосередковано, через продукти свого метаболізму може взаємодіяти з рядом молекул у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції. Так виникає оксидативно-нітративний стрес, який супроводжується нітруванням білків, перекисним окисненням ліпідів, розривами ДНК, змінами у клітинному сигналюванні, що призводить до порушення метаболізму і шляхів сигналювання у клітинах, які є характерними для діабетичних ускладнень [67].

Нітративний стрес (нітрування протеїнів за залишками тирозину) був ідентифікований принаймні для 50 захворювань людини і більш ніж у 80 різних захворюваннях, змодельованих на тваринах [105]. Виявлення нітрування білків не обов'язково прямо вказує на їхню патогенну роль, – воно може бути пов'язане зі збільшенням формування пероксинітриту разом з іншими активними формами нітрогену за умов виникнення та розвитку відповідного захворювання.

Свою патогенетичну роль пероксинітрит може виявляти не тільки модифікуванням властивостей білків, але і взаємодією з ліпідами та ДНК. Посилення розвитку оксидативного та нітративного стресу уповільнює

швидкість гліколізу і формування аденозинтрифосфату (АТФ) [165, 202]. Надмірне накопичення пероксинітриту може призвести до утворення пероксинітритної кислоти, розкладання якої спричиняє генерацію гідроксильних радикалів, що викликає ендотеліальне пошкодження клітин, порушуючи структуру судинної стінки. Також за умов утворення одониткових розривів ДНК, індукованих пероксинітритом, може відбуватися активація ядерного ензиму репараційного комплексу PARP-1, який, у свою чергу, за умов ЦД може посилювати розвиток оксидативно-нітративного стресу та бути залученим до патології діабетичних ускладнень [45].

Карбонільний/оксидативний стрес виникає внаслідок збільшення рівня активних карбонільних сполук (АКС) та активних форм кисню (АФО), небезпека яких полягає у їхній здатності брати участь у неензиматичних перетвореннях, які майже не піддаються контролю в клітині. До таких процесів належать вільнорадикальне окислення та неензиматичне глікозилювання (глікація) [4].

Карбонільний стрес – це стан, який супроводжується збільшенням вмісту карбонільних продуктів вільнорадикального окислення в організмі. До карбонільних продуктів метаболізму відносяться альдегіди, кетони, карбонові кислоти, вуглеводи та ін. Найбільш широке поширення серед них мають альдегіди. В організмі людини утворюється досить широкий спектр цих речовин, але найпоширеніші з них - малоновий діальдегід, гліоксаль, метилгліоксаль, акролеїн та ін. [11].

Альдегіди можуть виникати в результаті перетворень моносахаридів, зокрема, в процесі аутоокиснення глюкози, а також дезоксирибози, що входить до складу ДНК. Більшість реакцій синтезу альдегідів, протікають за участю вільних радикалів або пов'язані з використанням продуктів вільнорадикального окислення, що відбувається також при ОС. Як і карбонільний стрес, так і оксидативний стрес залучені в патогенезі розвитку ЦД. Отже, ендогенні альдегіди, що утворюються внаслідок ОС, здатні утворювати стійкі сполуки з білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами і іншими внутрішньоклітинними

речовинами, накопичення яких має цитотоксичні та генотоксичні ефекти для організму [161].

Порушення в електронтранспортному ланцюзі мітохондрій при гіперглікемії є основним механізмом виникнення оксидативно-нітративного стресу, який лежить в основі виникнення і розвитку хронічних діабетичних ускладнень. Зростання вмісту супероксид-аніону за умов гіперглікемії, а також здатність його при взаємодії з NO утворювати цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних і метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету. Активація PARP у результаті пошкодження ДНК пероксинітритом, разом із високим вмістом глюкози призводить до активації поліольного і гексозамінного шляхів, накопичення продуктів і попередників неензиматичного глікозилювання. Дані порушення призводять до значного посилення неензиматичного глікозилювання, порушення багатьох біохімічних і фізіологічних параметрів, збіднення клітин на ендогенні антиоксиданти, а також посилює запальні процеси із залученням імунокомпетентних клітин, що, в кінцевому результаті, значно посилюють оксидативно-нітративний стрес [13].

### **1.5. Метаболічні ефекти агматину**

Агматин є ендогенним катіонний аміном, що утворюється у результаті декарбоксілювання L-аргініну, за дії ферменту аргініндекарбоксілази [116, 120]. Біосинтез агматину, шляхом декарбоксілювання аргініну, конкурує з головними аргінінозалежними шляхами, а саме: азотистим обміном (цикл сечовини), утворенням поліамінів, синтезом NO та білків [186, 223].

Агматин може проникати в клітину з позаклітинного простору за рахунок функціонування транспортної системи путресцину. Одним з ефектів дії агматину на клітинному рівні є зменшення внутрішньоклітинного рівня поліамінів. Ці сполуки є важливими компонентами, задіяними у процесах реплікації ДНК, проліферації та підтриманні клітинного гомеостазу [187]. Агматин впливає на

рівень поліамінів, пригнічуючи активність першого і лімітуючого ензиму їхнього синтезу – орнітиндекарбоксілази. З іншого боку, агматин викликає зменшення вмісту поліамінів, індукуючи їхнє ензиматичне перетворення спермідин/спермін ацетилтрансферазою. Знижуючи рівень поліамінів у клітині, агматин зумовлює пригнічення процесів клітинного росту [186, 187].

Агматин може зменшити утворення NO трьома механізмами: (I), здійснюючи пряме інгібування iNOS; (II) шляхом ДАО-каталізацією окислення агматину в його альдегід – метаболіт, що є ще сильнішим і селективнішим інгібітором iNOS, ніж сам агматин; і (III) шляхом інгібування альдегід дегідрогеназної (AldDH) активності, що призводить до накопичення агматинового альдегіду і подальшого інгібування iNOS [94, 152].

Гіпоглікемічні механізми дії агматину, включають: (I) прямі інсуліно-подібні ефекти на клітини-мішені; (II) взаємодію з панкреатичними острівцями  $\beta$ -клітин, з метою збільшення вивільнення інсуліну; і (III) посилення наднирниками секреції ендорфінів через активацію імідазолінових рецепторів, що призводить до збільшення клітинного поглинання глюкози [59].

Гіпоглікемічні ефекти агматину можуть бути важливі не тільки для лікування діабету, але і для терапії складних розладів, при яких спостерігається порушення обміну глюкози (наприклад, невропатії, хвороби Альцгеймера, депресії та епілепсії).

Агматин може мати важливе значення у компенсації системних порушень, пов'язаних з діабетом, а саме у: (I) інгібуванні утворення кінцевих продуктів глікації; (II) регенерації нервів і нейропатичного зменшення болю при діабетичній нейропатії; (III) збільшенні нирками швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ); і (IV) підвищенні дії метформіну. Таким чином, цілий ряд досліджень підтверджують те, що агматин може бути використаний в якості терапевтичного засобу для лікування ЦД і пов'язаних з ним порушень [109].

Ін'єкції агматином викликають активацію  $I_2$ -рецепторів мозкового шару наднирників. Це призводить до підвищення секреції  $\beta$ -ендорфіну, який активує  $\mu$ -опіодні рецептори, що стимулює засвоєння глюкози периферичними тканинами.

Зокрема, на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів було показано, що введення агматину індукує експресію гена глюкозного транспортера GLUT 4, що покращує засвоєння глюкози скелетними м'язами. Крім того, активація  $\mu$ -опіоїдних рецепторів є негативним регулятором експресії гену фосфоенолпіруваткарбоксікінази у печінці, яка є ключовим ензимом глюконеогенезу. Як відомо, інтенсифікація цього метаболічного шляху є однією з причин гіперглікемії за умов діабету [94, 116, 120].

Було встановлено, що фізіологічна концентрація агматиту у плазмі крові людей складає 47 нг/мл [78], для щурів ця цифра становить 6,7 нг/мл [176]. Для щурів встановлена летальна доза агматину –  $317.6 \pm 16.3$  мг/кг маси тіла [175].

Залежно від місця локалізації, деградація агматину може здійснюватися двома різними шляхами. Ензим діаміноксидаза (ЕС 1.4.3.6), який міститься у периферичних тканинах, каталізує перетворення агматину до 4-гуанідобутирату, який потім окиснюється та гідролізуються специфічними ензимами і врешті виводиться з організму. Ензим агматиназа (ЕС 3.5.3.11, агматинуреагідролаза) здійснює розщеплення агматину в мозку після його вивільнення із пресинаптичних везикул з утворенням сечовини і путресцину [109].

Показано, що агматин у наномолярних концентраціях проявляє протекторну дію на мітохондрії, знижуючи їхнє набрякання внаслідок оксидативного стресу, можливо, діючи як скавенджер вільних радикалів, і запобігає  $\text{Ca}^{2+}$ -залежній індукції зміни проникності мембрани шляхом модуляції мембранного потенціалу мітохондрій та активації NF- $\kappa$ B [46, 65]. Перелічені механізми задіяні в апоптичній загибелі клітини. Тому роль агматину в захисті мітохондрій вважається однією з найважливіших у прояві загального цитопротекторного ефекту цієї сполуки на різні системи організму [109].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Умови проведення дослідів

Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях масою 150–180 г. Тварини перебували у стандартних умовах віварію, їм забезпечували вільний доступ до їжі та води. Експерименти проводились згідно “Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1985).

ЕЦД викликали внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США), розчиненого в 10 мМ цитратному буфері (рН 5,5), з розрахунку 60 мг на 1 кг маси тіла тварини. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали через 72 години після введення стрептозотоцину. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози більше 14 мМ. Починаючи з 3-го дня від моменту індукції діабету тваринам внутрішньом’язово вводили агматин (“Sigma”, США) у концентрації 20 мг/кг протягом 14 днів. Тварини були поділені на 4 групи: *перша* – контроль (К), *друга* – контрольні тварини, яким вводили агматин (К + Агм), *третья* – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД), *четверта* – тварини з ЕЦД, яким вводили агматин (ЕЦД + Агм).

### 2.2. Об’єкт досліджень

Об’єктом досліджень слугували лейкоцити і плазма периферичної крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету і на фоні введення агматину.



### 2.3. Забір крові дослідних тварин

Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 15-й день експерименту. Забір крові для досліджень проводили з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100).

### 2.4. Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом [211]

Для визначення концентрації глюкози використовували аналітичний набір для ферментативного визначення глюкози в крові «Філісіт-Діагностика» (Україна). Принцип методу базується на реакції окиснення глюкози до глюконової кислоти з утворенням пероксиду гідрогену ( $H_2O_2$ ). У присутності пероксидази  $H_2O_2$  реагує з фенолом та 4-амінофеназолом з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації глюкози в крові.

Для проведення аналізу до 0,9 мл стабілізуючого розчину (1,34 % розчин щавлевокислого натрію у 0,85 % NaCl) вносили 0,1 мл цільної крові. Проби центрифугували для осадження еритроцитів при 3000 об/хв впродовж 5 хв. Для приготування дослідної проби відбирали 0,1 мл надосадової рідини та додавали 1 мл розчину ензимів. Для приготування калібрувальної проби замість зразка додавали 0,1 мл калібрувального розчину глюкози. Вимірювання проводили проти холостої проби, яка містила 0,1 мл фізіологічного розчину (ФР). Через 20 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 498 нм. Розрахунок концентрації глюкози (в ммоль/л) здійснювали за формулою:

$$C = \frac{E_1 \cdot 10}{E_2},$$

де  $E_1$  і  $E_2$  – оптичні густини дослідної та калібрувальної проб відповідно; 10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л.

## 2.5. Виділення сумарної фракції лейкоцитів з периферичної крові щурів

Загальну фракцію лейкоцитів (далі – лейкоцити) виділяли у градієнті густини фікол-тріомбрас (ρ = 1,076 – 1,078) [49]. У пластикову пробірку вносили 3 мл фікол-тріомбрасу і зверху нашаровували 5 – 7 мл крові, попередньо розведеної забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) (рН 7,4) у співвідношенні 1:1. Центрифугували при 1000 об/хв впродовж 25 хв. Після центрифугування відбирали лейкоцити, які знаходяться на межі між еритроцитами та плазмою. Отриману суспензію лейкоцитів двічі промивали ЗФР при 1500 об/хв по 5 хв. Життєздатність клітин у тесті із трипановим синім становила не менше 98 %.

## 2.6. Визначення кількості лейкоцитів [25]

У пробірку вносили 0,02 мл рідини для розведення (3 % CH<sub>3</sub>COOH, підфарбований метиленовим синім; CH<sub>3</sub>COOH лізує еритроцити, а метиленовий синій фарбує ядра лейкоцитів) і 0,02 мл капілярної крові з антикоагулянтом. Суміш ретельно перемішували, заповнювали камеру Горяєва і залишали на 1–2 хв для осідання лейкоцитів.

Лейкоцити підраховували у двадцяти великих квадратах. Кількість лейкоцитів в 1 мкл крові обчислювали за формулою:

$$x = \frac{a \cdot 4000 \cdot v}{b}, \text{ де}$$

$x$  – кількість лейкоцитів в 1 мкл крові;  $a$  – кількість клітин, що були підраховані у певній кількості малих квадратів;  $b$  – кількість малих квадратів, в яких рахували лейкоцити;  $v$  – розведення крові.

## 2.7. Отримання лізатів лейкоцитів

Лізис лейкоцитів проводили буфером такого складу: 10 мМ трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 1 % тритон Х-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ NaF, 1 мМ

фенілметилсульфонілфторид (“Fluka”, Швейцарія), 5 мМ бензамідин (“Sigma”, США), 10 мкг/мл апротиніну (“Sigma”), 10 мкг/мл лейпептину (“Sigma”), 2 мкг/мл пепстатину (“Fluka”), 0,25 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1:10 за об’ємом. На 10 млн лейкоцитів давали 350 мкл приготовленого буферу. Лізис проводили протягом 60 хв на холоді.

Для отримання лізатів клітин для електрофоретичного розділення протеїнів 2,5 млн лейкоцитів розсуспендували у 0,1 мл буферу RIPA. Суспензію витримували при температурі 4<sup>0</sup>С протягом 20 хв, після чого центрифугували 15 хв при 12000 об/хв і 4<sup>0</sup>С. Надосадову рідину відбирали та прогрівали при 95<sup>0</sup>С протягом 5 хв у буфері Леммлі.

## **2.8. Дослідження агрегаційної здатності лейкоцитів**

Агрегацію лейкоцитів визначали стандартним турбідиметричним методом з використанням лазерного аналізатора агрегації “230 LA Биола” (“НПФ Биола”, Росія). Як індуктори агрегації використовували WGA – лектин зародків пшениці (специфічно зв’язується з N-ацетил-β,D-глюкозаміном і N-ацетилнейраміною (сіаловою) кислотою).

При дослідженні агрегації до 300 мкл суспензії лейкоцитів (2,5 · 10<sup>6</sup> клітин в 1 мл) після термостатування протягом 1 хв при 37<sup>0</sup>С додавали 10 мкл лектину в концентрації 32 мкг/мл. Процес агрегації реєстрували протягом 12-15 хв за зміною показника світлопропускання клітинної суспензії [6]. Показники агрегації визначали за агрегаційною кривою. Ступінь агрегації визначали, як максимальний приріст світлопропускання після додавання індуктора і виражали у відсотках. Швидкість агрегації визначали, як максимальний нахил кривої світлопропускання після додавання індуктора і виражали у відсотках за 1 хвилину [7, 28].

## **2.9. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі**

Концентрація протеїну визначали за методом Лоурі [144]. Результат виражали у мг протеїну на мл зразка.

## **2.10. Дослідження активності ферментів системи антиоксидантного захисту**

### **2.10.1. Визначення супероксиддисмутазної активності [29]**

Принцип методу визначення активності СОД ґрунтується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, які утворюються в результаті аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату. В результаті цієї реакції нітросиній тетразолій відновлюється з утворенням гідразинтетразолію (нітроформазау). У присутності СОД відновлення нітросинього тетразолію блокується. За кількістю нітроформазау - продукту відновлення нітротетразолію синього - можна оцінити активність ферменту. Реакцію проводять при температурі 24–25<sup>0</sup>С.

Реактиви:

1. Інкубаційна суміш, до складу якої входять 39 мМ ЕДТА-Na, 114 мМ нітротетразолій синій (мета форма), 54 мМ феназинметасульфат, розчинені у 0,15 М фосфатному буфері (рН=7,8).
2. Розчин НАДН (152 мг NADH розчиняють в 100 мл трис- ЕДТА буферу рН=8,0).

Супероксиддисмутазну активність визначали в супернатанті з розрахунку: 2 мл інкубаційної суміші; 0,1 мл розчину НАДН. У холосту пробу замість супернатанту додавали буфер лізису. Через 10 хв проводили вимірювання екстинкції при 540 нм проти води у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Активність ферменту визначали за відсотком блокування утворення нітроформазау. Розрахунки проводили за формулою:

$$\% \text{ блокування} = \frac{E_{\text{х.пр.}} - E_{\text{д.пр.}}}{E_{\text{х.пр.}}} \times 100\% , \text{ де}$$

$E_{\text{х.пр.}}$  та  $E_{\text{д. пр.}}$  – екстинкція холостої та дослідної проб, відповідно.

Супероксиддисмутазну активність виражали в умовних одиницях (1 ум. од.= 50 % блокування реакції утворення нітроформазау) на 1 мг білка.

### 2.10.2. Визначення каталазної активності [16]

Принцип методу базується на здатності  $\text{H}_2\text{O}_2$  утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення перекисних сполук молібдену залежить від кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$  в розчині, тобто від активності каталази в пробі.

Реактиви:

1. 0,03% розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
2. 0,25 н розчин  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
3. 4% розчин молібдату амонію на 0,025 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Каталазну реакцію запускали додаванням 0,1 мл лізату лейкоцитів до 2 мл 0,03 % розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Холоста проба містила 1 мл розчину молібдату амонію та 2 мл  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Реакцію у дослідній пробі зупиняли через 10 хв додаванням 1 мл 0,25 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  та 1 мл розчину молібдату амонію. У холосту пробу вносили 1 мл 0,25 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  та 0,1 мл лізату лейкоцитів.

Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично при 410 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l} \text{ (мкмоль } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ за 1 хв. на 1 мг білка), де}$$

$\Delta E$  – різниця екстинкції холостої та дослідної проб;

$V$  – загальний об'єм реакційної суміші в кюветі;

$n$  – розведення вихідного екстракту;

$\epsilon$  - молярний коефіцієнт екстинкції комплексу  $\text{H}_2\text{O}_2$  з молібдатом амонію при  $\lambda = 410$  нм, становить  $22200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , в розрахунках використовували величину мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражену як  $22,2 \text{ cm}^2/\text{мкмоль}$ ;

$C$  – концентрація білка, мг/мл;

$t$  – час реакції (10 хв);

$\alpha$  – об'єм лізату лейкоцитів, мл;

$l$  – довжина оптичного шляху, см.

### 2.10.3. Визначення глутатіонпероксидазної активності [18]

Активність глутатіонпероксидази вимірюється за швидкістю окиснення відновленого глутатіону у присутності гідроперекису третинного бутилу. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з реактивом Еллмана (0,01 М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі) з утворенням кольорового продукту – тіонітрофенільного аніону. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з реактивом Еллмана.

Реактиви:

1. 0,1М трис-НСІ буфер, рН 8,5, що містить 6 мМ ЕДТА та 12 мМ азид натрію. Безпосередньо перед дослідом на цьому розчині готують 4,8 мМ розчин глутатіону (GSH);
2. 0,1М трис-НСІ буфер, рН 8,5;
3. 20 % ТХО;
4. Реактив Еллмана – 0,01 М ДТНБК на метанолі;
5. 20 мМ гідроперекис третинного бутилу.

0,1 мл лізату лейкоцитів ( $V_{\text{ліз}}$ ), що містив 1 мг білка, інкубували з 0,83 мл 0,1 М трис-НСІ буферу, що містив 6 мМ ЕДТА, 12 мМ  $\text{NaN}_3$  і 4,8 мМ GSH (рН 8,5) при  $37^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. До проби додавали 0,07 мл 20 мМ гідроперексиду трет-бутилу та інкубували 5 хвилин ( $t$  – час інкубації). Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл холодного 20 % розчину ТХО. Усі додані компоненти складають об'єм проби, який позначимо через  $a$ . Для приготування

контрольної проби додавали всі перелічені вище реагенти, однак осадження білків ТХО проводили без попередньої інкубації лізату лейкоцитів з трис-НСІ буфером, який містив ЕДТА,  $\text{NaN}_3$ , GSH та трет-бутил.

Пробу з доданою ТХО центрифугували при 10000g протягом 10 хвилин. До 2 мл 0,1 М трис-НСІ буферу (рН 8,5) додавали 0,02 мл супернатанту ( $V_{\text{super}}$ ) і 0,02 мл реактиву Еллмана. Об'єм отриманої реакційної суміші позначимо як  $b$ .

Через 5 хвилин проби фотометрували при довжині хвилі 412 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Використовуючи наведені в тексті позначення, обрахунок глутатіонпероксидазної активності проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot a \cdot b}{\varepsilon \cdot V_{\text{ліз}} \cdot V_{\text{super}} \cdot C \cdot t \cdot l},$$

$\Delta E$  – різниця екстинкції холостої та дослідної проб;

$\varepsilon$  – молярний коефіцієнт екстинкції тіонітрофенільного аніона, становить  $11400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^1$ , в розрахунках використовували величину мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражену як  $11,4 \text{ cm}^2/\text{мкмоль}$ .

Отримані результати виражали в нмоль GSH за 1хв на 1 мг білка.

#### **2.10.4. Визначення глутатіонредуктазної активності [97]**

Принцип методу базується на зменшенні вмісту НАДФН внаслідок глутатіонредуктазної реакції у дослідній пробі, яке вимірюється спектрофотометрично при  $\lambda = 340 \text{ нм}$ .

Інкубаційне середовище містило 1,8 мл 0,01 М  $\text{K}_2\text{Na}$  - фосфатного буферу (рН 7,4), 0,1 мл 0,008 М розчину окисленого глутатіону (приготованого на 0,01 н  $\text{NaOH}$ ) і 0,1 мл 0,002 М НАДФН (приготованого на 1 %-му розчині  $\text{NaHCO}_3$ ). Реакцію проводили в кюветі спектрофотометра при  $37^\circ\text{C}$  і запускали додаванням 0,05 мл лізату лейкоцитів. Для розрахунку використовували зменшення оптичної густини за 10 хвилин.

Розрахунок ферментативної активності проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l}, \text{ де}$$

$\Delta E$  - різниця екстинкції за час проходження реакції;

$V$  - об'єм інкубаційного середовища, мл;

$\varepsilon$  - молярний коефіцієнт екстинкції для NADPH, що становить  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , в розрахунках використовували величину мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражену як  $6,22 \text{ cm}^2/\text{мкмоль}$ ;

$t$  – час проходження реакції, хв;

$C$  – концентрація білку, мг/мл;

$\alpha$  – об'єм лізату лейкоцитів, який вносять у кювету;

$l$  – довжина оптичного шляху.

Глутатіонредуктазну активність виражали в нмоль за 1 хв. на 1 мг білку.

## **2.11. Дослідження проявів карбонільно-оксидативного стресу**

### **2.11.1. Визначення вмісту відновленого глутатіону [25]**

Принцип методу визначення вмісту відновленого глутатіону ґрунтується на реакції сульфгідрильних груп з реактивом Елмана (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота).

Реактиви:

1. 0,36 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
2. 10 %  $\text{NaWO}_4$ .
3. 2 М трис-НСІ буфер.
4. Ацетон.
5. Реактив Елмана.
6. Відновлений глутатіон.

До 0,5 мл лізату лейкоцитів додавали 3,5 мл 0,36 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , перемішували та інкубували 10 хв з метою осадження білків. Після цього додавали 1 мл 10 %



NaWO<sub>4</sub>. Отриманий густий осад відділяли шляхом центрифугування при 10000 g протягом 10 хв. У дослідну пробу вносили 1 мл супернатанту, 0,75 мл 2 М трис-НСІ буферу (рН = 8,4), 0,5 мл ацетону і 0,25 мл реактиву Елмана.

Перед кожним вимірюванням готували стандартну пробу, яка замість супернатанту містила 0,008 мг відновленого глутатіону в 1 мл 0,36 н Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Вимірювання проводили при 412 нм.

Концентрацію GSH розраховували за формулою:

$$\text{GSH} = \frac{(E_x - E_\delta) \cdot n}{S_t \cdot C} \text{ нмоль на 1 мг білка, де}$$

$E_\delta$  – екстинція дослідної проби;

$E_x$  – екстинція холостої проби;

$n$  – розведення;

$S_t$  – концентрація GSH у стандартній пробі;

$C$  – концентрація білка.

### 2.11.2. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів [26]

Принцип методу ґрунтується на активації ПОЛ іонами двоцвалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі в кислому середовищі малоновий диальдегід (МДА) реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм.

Реактиви:

1. 10 мМ К,Na-фосфатний буфер на 125 мМ КСІ, рН 7,4;
2. 1 мМ КМnO<sub>4</sub>;
3. 10 мМ FeSO<sub>4</sub>;
4. 0,7 мМ ТБК;
5. 1 н НСІ;
6. 20 % ТХО;
7. бутанол.

До 0,2 мл лізату лейкоцитів, що містив 1 мг білка, додавали 3 мл 10 мМ К,Na-фосфатного буферу, приготованого на 125 мМ КСl (рН 7,4) та 0,5 мл 1 мМ КМnO<sub>4</sub>. Для індукції ПОЛ двічі з інтервалом у 10 хвилин додавали 0,5 мл 10 мМ FeSO<sub>4</sub>. Ще через 5 хв. реакцію зупиняли за допомогою 20 % ТХО (1 мл) і відцентрифугували. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1 н НСl і 1 мл 0,7 мМ ТБК та інкубували на водяній бані при температурі 95-100°C протягом 20 хвилин. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, перемішували і центрифугували протягом 10 хвилин при 3000 об/хв. Вимірювання екстинкції проводили у верхньому бутаноловому шарі при  $\lambda=532$  нм.

Обрахунок проводили за формулою:

$$[\text{ТБК - позитивні продукти}] = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V_3 \cdot C}, \text{ де}$$

E – екстинкція дослідної проби;

V<sub>1</sub> – об'єм бутанолу;

V<sub>2</sub> – об'єм проби;

V<sub>3</sub> – об'єм супернатанту;

$\varepsilon$  – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу МДА з ТБК, що становить 156000 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, у розрахунках використовували величину мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражену як 156 см<sup>2</sup>/мкмоль;

C – концентрація білка, мг/мл.

Отримані результати виражали в нмоль на 1 мг білка лейкоцитів.

### 2.11.3. Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації (AOPPs)

Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації (AOPPs) ґрунтується на спектрофотометричному вимірюванні за Witko-Sarsat et al. (1996) [222]. Для дослідження використовували: 200 мкл плазми крові, розведеної 1: 5 ЗФР (рН 7,4) (200 мкл лізату лейкоцитів, розведеного 1: 2 ЗФР), 200 мкл стандартного розчину хлораміну-Т (від 0 до 100 мкмоль L<sup>-1</sup>) для калібрування і 200 мкл ЗФР в якості

стандарту, які вносили в мікропланшети. Після того додавали 10 мкл 1,16 М йодиду калію (KI) і 20 мкл оцтової кислоти. Абсорбцію реакційної суміші визначали при 340 нм проти холостої проби. Концентрацію AOPPs виражали в мкмоль/г білка.

#### **2.11.4. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікації (AGEs)**

Вміст продуктів глікації (AGEs) у плазмі крові визначали методом Nakayama et al. [155]. Плазму розводили в ЗФР (рН 7,4) у співвідношенні 1:50. Лізати лейкоцитів розводили в 0,1 н NaOH. В якості стандарту використовували препарат БСА (1 мг мл<sup>-1</sup> 0,1 н NaOH). Рівень AGEs в плазмі або лізатах лейкоцитів визначали шляхом вимірювання флюоресценції при довжині хвилі збудження 370 нм і довжині хвилі випромінювання 440 нм [174]. Інтенсивність флюоресценції зразків виражали у вигляді AU/мг білка.

### **2.12. Дослідження реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів**

#### **2.12.1. Кількісна оцінка вмісту полімеризованого актину методом флюоресцентної мікроскопії з використанням фалоїдину Alexa Fluor 350**

У молекулярній біології для маркування F-актину застосовують флюоресцентний і біотинільований фалоїдин, а також похідні фалацидину. Ці фалотоксини, виділені зі отруйного гриба *Amanita phalloides*, є біциклічними пептидами, які відрізняються між собою лише двома амінокислотними залишками. Фалоїдин і фалацидин містять триетерний місток між залишком цистеїну і триптофану, який формує внутрішні кільцеві структури. Мічені фалотоксини мають подібну спорідненість як до великих, так і малих філаментів актину, зв'язуючись в стехіометричному співвідношенні (одна молекула фалотоксину на одну субодиночку актину) з актином в м'язових і нем'язових клітинах багатьох видів рослин і тварин. На відміну від деяких анти-актинових антитіл, фалотоксини не зв'язують мономерний G-актин. У разі застосування

мічених фалотоксинів неспецифічне фарбування є незначним і контраст між зафарбованими і нефарбованими ділянками надзвичайно великий [220].

Для дослідження рівня полімеризації актину використовували відмиті лейкоцити, які наносили на предметне скло у кількості 100 000 клітин на одну краплю. Спочатку клітини фіксували 4 % параформальдегідом (без метанолу), який готували на ЗФР+ (KCl – 200 мг/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 200 мг/л, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 2,16 г/л, NaCl – 8 г/л, CaCl<sub>2</sub> – 0,1 г/л, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 0,1 г/л; рН 7,5) впродовж 10 хв при 4°C, а потім 20 хв при 20°C. Після фіксування клітини тричі промивали ЗФР+ та інкубували у 50 ммоль/л NH<sub>4</sub>Cl/ЗФР+ впродовж 5 хв при 20°C і знову відмивали ЗФР+. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,03 % розчином Тритону Х-100 в ЗФР+ (5 хв, 0°C), після чого тричі відмивали 0,2 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА), який готували на тріс-НСІ буфері (ТБС: 2,5 ммоль/л НСІ, 13 ммоль/л NaCl, рН 7,4). Клітини блокували у 3 % розчині БСА/ТБС впродовж 30 хв при 20°C. Для візуалізації F-актину клітини інкубували 1 год при 20°C з розведеним Phalloidin Alexa Fluor 350 у ЗФР+. Після цього їх знову відмивали у 0,2 % розчині БСА/ТБС (5 разів по 5 хв) та у ТБС. Зразки покривали середовищем для заливу, що містив DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octan) і оцінювали за допомогою флюоресцентного мікроскопу (Nikon Optiphot 2). Оцифрування результатів інтенсивності сигналів флюоресцентної мікроскопії на знімках проводили за допомогою програми Image J і представляли як середнє арифметичне значення інтенсивності свічення однієї клітини, яке виражали в умовних одиницях. Репрезентативні фотографії представляють середнє значення інтенсивності сигналів, обчислене для кожної групи (n = 5–6).

### **2.12.2. Фракціонування актину в лізатах лейкоцитів [132, 133, 134]**

Лізис лейкоцитів ( $1,5 \times 10^6$ ) проводили в 250 мкл буферу, що містив 0,5 % Тритон Х-100, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ЕДТА, 25 мМ Трис-НСІ (рН 7,5) та коктейль інгібіторів протеаз: 10 мкг/мл апротиніну (“Sigma”), 10 мкг/мл лейпептину (“Sigma”), 2 мкг/мл пепстатину (“Fluka”), протягом 10 хвилин (4°C).

З метою вивчення процесів реорганізації актинового цитоскелету, було застосовано наступну схему фракціонування клітинних лізатів. Лізат лейкоцитів центрифугували 10 хв при 10 000 об/хв. У результаті було отримано надосадову рідину ( $C_1$ ), яка містила короткі філаменти та мономери актину та осад ( $O_1$ ), який містив довгі актинові філаменти цитоскелету. 10 мкл надосадової рідини відбирали для SDS-ПААГ електрофорезу, решту піддавали високошвидкісному центрифугуванню (1 год, 100000 об/хв) для розділення мономерів актину, які залишалися у надосадовій рідині ( $C_2$ ) та коротких філаментів актину, які містилися в осаді ( $O_2$ ).

Відібрані осади ( $O_1$  та  $O_2$ ) та надосадові рідини ( $C_1$  та  $C_2$ ) прогрівали при 95 °С протягом 5 хв у буфері Леммлі (62,5 мМ трис-НСІ (рН 6,8), 1 мМ ЕДТА, 2 % SDS, 5 %  $\beta$ -меркаптоетанол, 10 % гліцерин, 0,4 % бромфеноловий синій).

### **2.12.3. Електрофорез білків лізатів лейкоцитів у поліакриламідному гелі [13, 134]**

Осади ( $O_1$  та  $O_2$ ) та надосадові рідини ( $C_1$  та  $C_2$ ) піддавали SDS-ПААГ електрофорезу. Білки розділяли у блоках 15 % поліакриламідного гелю у присутності додецилсульфату натрію у буферній системі Лемлі.

Для приготування гелю використовували такі реактиви:

1. Розчин мономерів "АА": 30% акриламід та 0,8 % метиленбісакриламід;
2. Буфер "А" для розділяючого гелю: 0,375 М трис-НСІ, рН 8,8;
3. Буфер "Б" для концентруючого гелю: 0,125 М трис-НСІ, рН 6,8;
4. 10% персульфат амонію (APS).
5. 10% додецилсульфат натрію (SDS)
6. Буфер для електрофорезу (0,025 М трис-НСІ, рН 8,3, 0,192 М гліцин, 0,1 % SDS).

В установку для електрофорезу, у простір між двома скляними пластинами вносили 15 % розділяючий (3,28 мл  $H_2O$ ; 2,64 мл «АА»; 2 мл «А»; 0,8 мл SDS; 0,4 мл APS; 0,04 мл TEMED) та 5 % концентруючий (1,83 мл  $H_2O$ ; 0,39 мл «АА»; 0,75 мл «Б»; 0,3 мл SDS; 0,3 мл APS; 0,03 мл TEMED) гелі. В електрофоретичну

установку заливали буфер для електрофорезу. Електрофорез проводили протягом 2,5 год при силі струму 15 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт на одну пластину. При переході проб з концентруючого гелю у розділяючий, силу струму збільшували до 25 мА на одну пластину.

#### **2.12.4. Імуноблотинг білків лізатів лейкоцитів**

Після електрофоретичного розділення лізатів клітинних фракцій здійснювали перенесення білків з ПААГ під дією електричного поля на нітроцелюлозну мембрану [132, 133] з наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Перенесення проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА, в буфері, що містив 25 мМ трис-НСl (рН 8,3), 20 % метанол та 192 мМ гліцин [Campos K.E., 2003]. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 12 год при 4°C 2 % розчином БСА в ЗФР (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (рН 7,3)) з 0,05 % твін-20. Згідно до поставленої мети мембрану інкубували з першими антитілами (Monoclonal Anti-Actin antibody produced in mouse, Sigma, США), розведеними у 10 000 раз у блокуючому буфері, протягом 1,5 год з наступним промиванням буфером для блокування (5 разів по 3 хв). Як другі антитіла використовували анти-мишачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Anti-Mouse Ig G (whole molecule) – peroxidase, Sigma, США), за розведення у блокуючому буфері у 1000 разів. Інкубацію з другими антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали ЗФР/0,1 % твін-20 (5 разів по 3 хв). Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору реактивів для посиленої хемілюмінесценції (Millipore, США). Час експонування мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав у середньому 5–15 хв. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз результатів вестерн-блотингу здійснювали з використанням програми GelPro 3.1.

Для контролю ідентичності вмісту білків у всіх пробах, мембрану відмивали від антитіл буфером для відмивки (забуферений фізіологічний

розчин/0,1 % твін-20) та, в подальшому, блокуючим буфером. Після цього її інкубували з першими анти- $\alpha$ -тубулін антитілами (Millipore, США), другими антитілами та проводили експозицію отриманих блотів на рентгенівську плівку.

### **2.13. Статистична обробка результатів**

Статистична обробка результатів дослідження здійснювалася з допомогою програми Microsoft Excel. Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими в результаті досліджень (середнє арифметичне значення –  $M$ ; стандартна похибка середнього арифметичного –  $m$ ).

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

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів глікації (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 (AGEs) в лейкоцитах периферичної крові. AGEs утворюються шляхом неензиматичної взаємодії редуруючих цукрів або окиснених ліпідів і білків, амінофосфоліпідів або нуклеїнових кислот. Утворення AGEs може призвести до внутрішньоклітинних модифікацій білків, у тому числі тих, які беруть участь у регуляції експресії генів [103].

За умов діабету вміст AGEs у лейкоцитах зменшувався на 22 %, а у плазмі – збільшувався на 32 % порівняно з контрольною групою. Введення агматину здоровим тваринам не спричиняло достовірних змін у вмісті AGEs. Після введення агматину тваринам з діабетом спостерігали зниження цього показника у плазмі в 1,8 рази та достовірне збільшення вмісту кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах майже до контрольних значень (рис. 3.1).

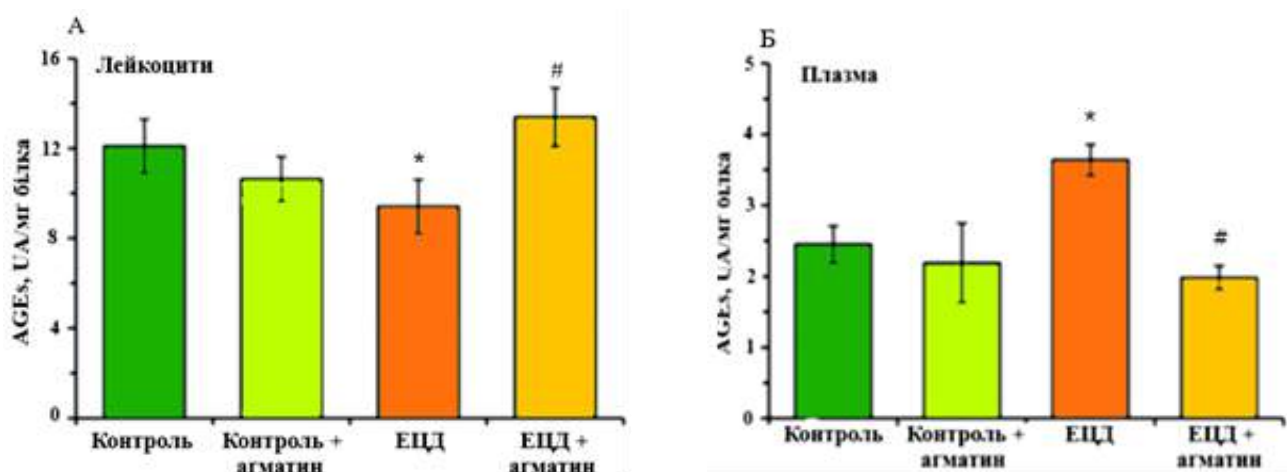


Рис. 3.1. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів глікації (AGEs) у лізатах лейкоцитів (А) та плазмі крові (Б) щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

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



Гіпоінсулінемія зумовлює гальмування транслокації транспортера глюкози GLUT 3 від внутрішньоклітинних везикул до плазматичної мембрани лейкоцитів, з чим може бути пов'язане зменшення внутрішньоклітинного утворення AGEs [217].

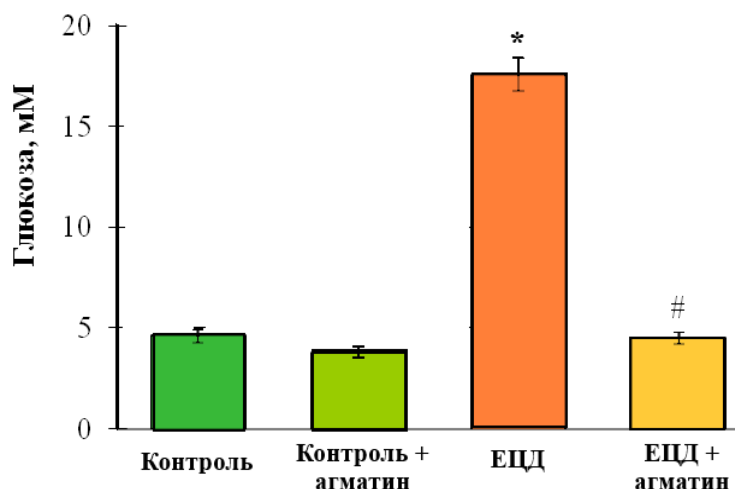


Рис. 3.2. Концентрація глюкози в крові тварин у нормі, за умов експериментального цукрового діабету і на фоні введення агматину ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

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

Відомо, що активація агматином  $I_2$ -імідазолінових рецепторів в мозковій речовині надниркових залоз підвищує секрецію  $\beta$ -ендорфінів, що призводить до активації  $\mu$ -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 [159]. Таким чином, внаслідок зниження концентрації глюкози у плазмі крові тварин з ЕЦД після введення агматину(рис 3.2), зменшується вміст AGEs (рис 3.1), проте збільшується їхній вміст у лейкоцитах.

### 3.1.1. Підсумки

За умов ЕЦД вміст кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах зменшувався, а у плазмі збільшувався, порівняно з контролем, що можна пояснити збільшенням вмісту глюкози у плазмі крові діабетичної групи тварин. На фоні введення агматину хворим тваринам спостерігали зростання вмісту кінцевих продуктів глікації в лейкоцитах, та зменшення їхньої кількості у плазмі, порівняно з діабетичною групою, що пов'язано із здатністю агматину викликати активацію I<sub>2</sub>-рецепторів мозкового шару наднирників, що призводить до підвищення секреції β-ендорфіну, який активує μ-опіоїдні рецептори, а це стимулює засвоєння глюкози периферичними тканинами.

1. **Bila I.** Agmatine prevents oxidative-nitrative stress in blood leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus / I. Bila, O. Dzydzan, I. Brodyak, N. Sybirna. *Open Life Sciences*. 2019; № 14: P. 299–310.

2. **Біла. І.** Вплив агматину на вміст окремих метаболітів оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах крові за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету / І. Біла, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 9–11 квітня 2019 р.: збірник тез. Львів. 2019. С. 58.

### **3.2. Дослідження впливу агматину на зміну 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) та активності ферментів системи антиоксидантного захисту**

Відомо, що зростанням вмісту прооксидантів, в тому числі АФО внаслідок порушення ензиматичних реакцій призводить до активації процесів вільнорадикального окиснення та накопичення стійких цитотоксичних продуктів,

які утворюються майже з усіх класів біомолекул. Провідна роль у формуванні діабетичних ускладнень належить модифікації ліпідів внаслідок їхнього пероксидного окиснення. За фізіологічних умов система реакцій ПОЛ контролюється різноманітним антиоксидантними захисними механізмами. Порушення такого контролю, зокрема за умов цукрового діабету, призводить до інтенсифікації процесів ПОЛ та накопичення в організмі продуктів ліпопероксидації – високореакційних молекул, які залучаються до ушкоджень клітинних структур [87].

Гідропероксидації, 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 при ЦД [215].

За умов діабету відбувалось зростання кількості ТБК-позитивних продуктів в 1,4 рази 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. 3.3).

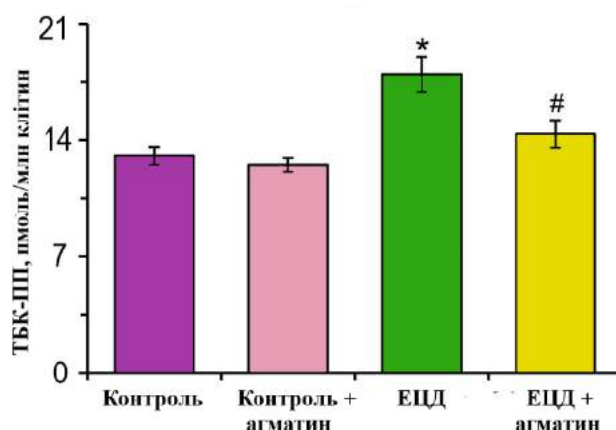


Рис. 3.3. Вміст ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

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

В умовах оксидативного стресу відбувається утворення AOPPs, внаслідок накопичення супероксид аніону ( $O_2^{\cdot-}$ ), який зазнає дисмутації до пероксиду водню під дією мієлопероксидази нейтрофілів, у присутності іонів галогенів (в основному  $Cl^-$ ). Це призводить до утворення реактивних хлоровмісних сполук, які безпосередньо беруть участь в модифікації нативної структури білків. AOPPs розпізнаються і зв'язуються з тими самими рецепторами, що і AGEs, – RAGE (англ. receptor for advanced glycation end products).

За умов діабету, вміст AOPPs у плазмі підвищувався приблизно в 1,6 рази порівняно з контролем, а у лейкоцитах достовірних змін не відбувалось (рис 3.4).

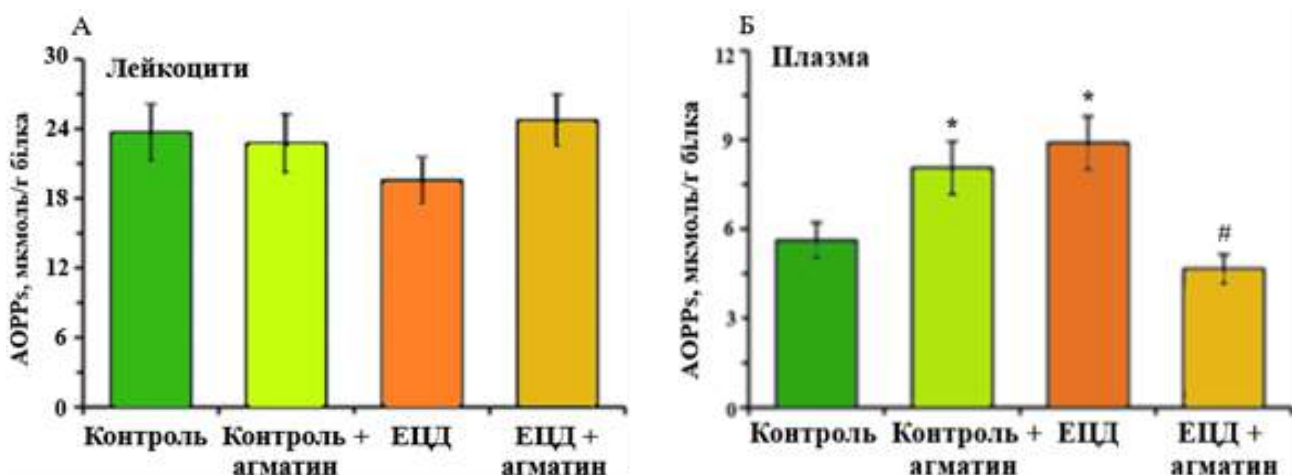


Рис. 3.4. Вплив агматину на вміст кінцевих продуктів оксидації (AOPPs) у лізатах лейкоцитів (А) та плазмі крові (Б) щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

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

Після введення агматину здоровим щурам рівень AOPPs 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 AOPPs у плазмі крові може бути пов'язано з гіпоглікемічною дією агматину в організмі піддослідних тварин [82].

Характерним показником прогресування патологічних змін при ЦД є інтенсифікація процесів утворення АФО, що призводить до виснаження як вмісту антиоксидантів, так і порушення роботи ензимів антиоксидантної системи, внаслідок чого розвивається оксидативний стрес. Тому стан антиоксидантної системи клітини за умов ЦД є одним із основних показників рівня захисних можливостей організму.

За умов ЦД, відбувається порушення роботи електрон-транспортного ланцюга, що, у свою чергу, викликає надпродукцію супероксид-аніона ( $O_2^{\cdot-}$ ), який за нормальних умов нейтралізується антиоксидантною системою. Відомо, що вагомий внесок у формування пізніх діабетичних ускладнень робить саме порушення рівноваги між продукцією вільних радикалів і активністю антиоксидантних ферментів, серед яких важлива роль належить СОД, каталазі, ГПО та ГР [84, 196]. Зміни у внутрішньоклітинному метаболізмі, інтенсифікація процесів неензиматичного глікозилювання та розвиток оксидативно-нітративного стресу в клітинах крові на фоні тривалої гіперглікемії є основними факторами, що індукують патологічні зміни у структурі їхніх компонентів і впливають на їх функціональний стан. Високий рівень глюкози крові спричиняє виникнення запальних процесів, на що в першу чергу реагують клітини крові, зокрема лейкоцити [118].

У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що активність ензимів антиоксидантної системи достовірно знижується у лейкоцитах крові щурів за умов ЕЦД (рис. 3.5–3.6). Отримані нами зміни узгоджуються із літературними даними [10, 41, 108]. У роботі Ференц [82] показано, що за умов ЕЦД в лейкоцитах значно підвищується вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів. Нітрування протеїнових молекул по залишках тирозину

впливає на їхню структуру і функціональні властивості. Модифікація залишків Тир-34 у структурі молекули СОД призводить до інактивації ензиму [100, 131].

Введення агматину контрольній групі щурів не спричиняло достовірних змін в активності ферментів антиоксидантного захисту (рис. 3.5–3.6). У своїх роботах Патель та його співробітники [170], повідомили, що гіперглікемія призводить до збільшення утворення пероксиду водню, гіперполяризації мітохондріальних мембран та зниження експресії генів каталази.

Після введення агматину тваринам з ЕЦД спостерігали підвищення активності СОД і каталази порівняно з діабетичною групою у 2,4 рази та 1,4 рази, відповідно.

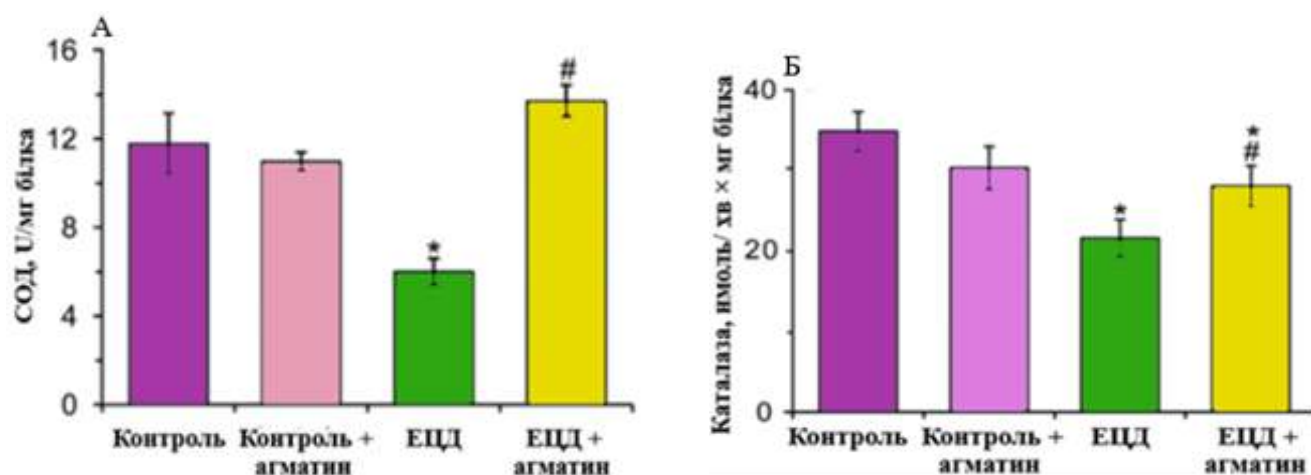


Рис. 3.5. Вплив агматину на активність СОД (А) та каталази (Б) у лейкоцитах крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

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

Зростання активності каталази у лейкоцитах крові діабетичних тварин після введення агматину можна розглядати як результат зниження неензиматичного глікозилювання білків, внаслідок прояву гіпоглікемічних властивостей досліджуваного поліаміну [81].

За умов діабету зниження активності ГПО, яка окиснює глутатіон, відновлюючи гідропероксиди ліпідів та інші органічні сполуки, в 1,3 раза, порівняно з контролем (рис. 3.6, А), тісно пов'язане із функціонуванням ГР та рівнем відновленого глутатіону.

Зниження рівня GSH у лейкоцитах крові щурів з ЕЦД на 27 %, порівняно з контролем, (рис. 3.6, Б) може бути показником довготривалих ускладнень діабету. Гіперліпідемія, запалення і зміна антиоксидантного профілю є типовими ускладненнями ЦД і є результатом зниження співвідношення GSH / GSSG [55, 179]. Активність ензиму ГР за умов ЕЦД знижувалась в 1,3 рази, порівняно з її активністю в лейкоцитах здорових щурів.

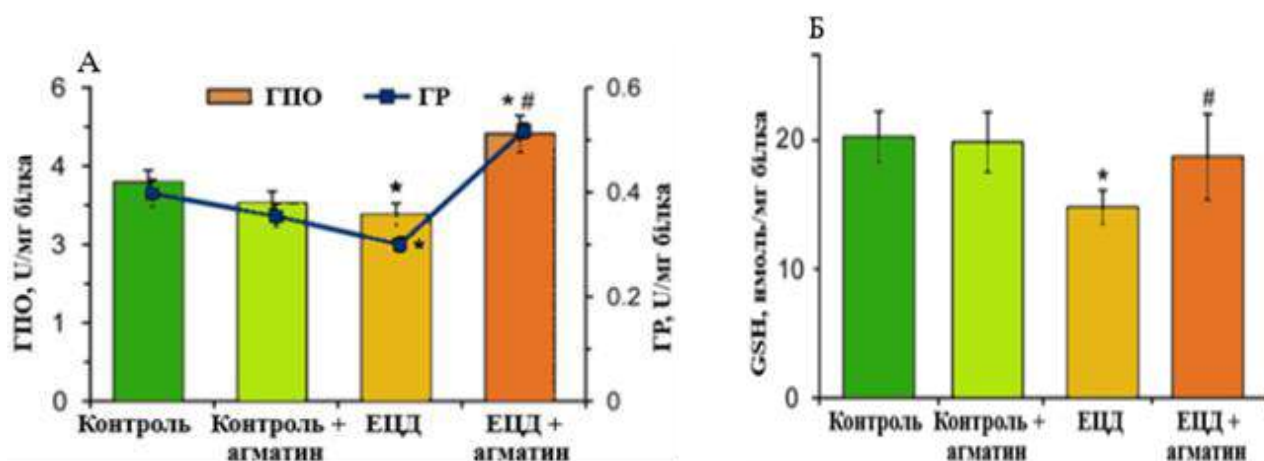


Рис 3.6. Активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази (А) та вміст відновленого глутатіону (Б) в лейкоцитах крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину (  $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

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

Нами виявлено, що введення агматину тваринам з ЕЦД обумовлювало зростання активності ГПО на 43 %, ГР – на 72 % (рис. 3.5, А). Зростання рівня

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

### 3.2.1. Підсумки

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 окисації у лейкоцитах та достовірне зменшення їхньої кількості у плазмі порівняно з діабетом, що пов'язано з гіпоглікемічною дією агматину.

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

1. **Bila I.** Agmatine preventes oxidative-nitrative stress in blood leukocytes under streptozotocin-induced diabetes mellitus / I. Bila, O. Dzydzan, I. Brodyak, N. Sybirna. *Open Life Sciences*. 2019; № 14: P. 299–310.

2. **Біла. І.** Вплив агматину на вміст окремих метаболітів оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах крові за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету / І. Біла, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 9–11 квітня 2019 р.: збірник тез. Львів. 2019. С. 58.

3. **Bila I.** State of the antioxidant system of blood leukocytes under conditions of experimental diabetes mellitus on the background of agmatine injection / I. Bila, I. Brodiak, N. Sybirna // 4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, May 20–24, 2019: Abstracts. Kyiv, 2019. P. 366.



### **3.3. Визначення впливу агматину на функціональний стан лейкоцитів крові щурів у нормі та за умов ЕЦД шляхом дослідження WGA-індукованої агрегації клітин**

Одним із компонентів порушень транспортного потенціалу крові є агрегація клітин, яка є важливим патогенетичним механізмом розвитку захворювань і їхніх ускладнень. При такому патологічному стані, як запалення, спостерігають підвищену агрегацію лейкоцитів та інших клітин крові. Різноманітність рецепторів лейкоцитів визначає їхню чутливість до численних подразників, будучи при цьому важливим показником потенційної реактивності [6].

Гіперглікемія у разі діабету викликає порушення вуглеводного обміну й утворення кінцевих продуктів глікозилювання – AGEs, що призводить до зміни експресії генів і активності клітинних глікозилтрансфераз і глікозидаз – ензимів синтезу глікокон'югатів [136]. Глікокон'югати відіграють важливу роль у різних біологічних процесах, зокрема, гомеостазі глюкози, контролі якості білків, запаленні, міжклітинному сигналюванні та клітинній адгезії. Наявність змінених вуглеводних детермінант модифікує біологічну активність глікокон'югатів. Взаємодія модифікованого ліганду з його специфічним рецептором призводить до порушень на рівні трансмембранного і внутрішньоклітинного сигналювання [96, 142].

За умов ЦД у разі використання як індуктора агрегації лектину WGA ступінь і швидкість агрегації лейкоцитів зростали в 2,0 та 2,4 рази відповідно порівняно зі значеннями у контрольній групі (рис. 3.7, таблиця 3.1).

Таблиця 3.1.

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	$4,3 \pm 0,75$	$29,7 \pm 3,1^*$	$10,5 \pm 1,9^*$	$34,3 \pm 2,9^\#$

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

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- $\beta$ ,D-глюкозамінові і N-ацетилнейрамінові фрагменти. Такі особливості термінальних залишків глікокон'югатів плазматичної мембрани лейкоцитів за умов патології можуть впливати як на динамічні, так і на кінетичні показники процесу агрегації клітин. Крім цього отримані результати можуть бути пов'язані з інтенсифікацією синтезу гібридних типів N-гліканів за участю активованого GnTIII-ензиму (N-ацетилглюкозамініл-трансфераза III) [207].

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 (рис. 3.7, таб. 3).

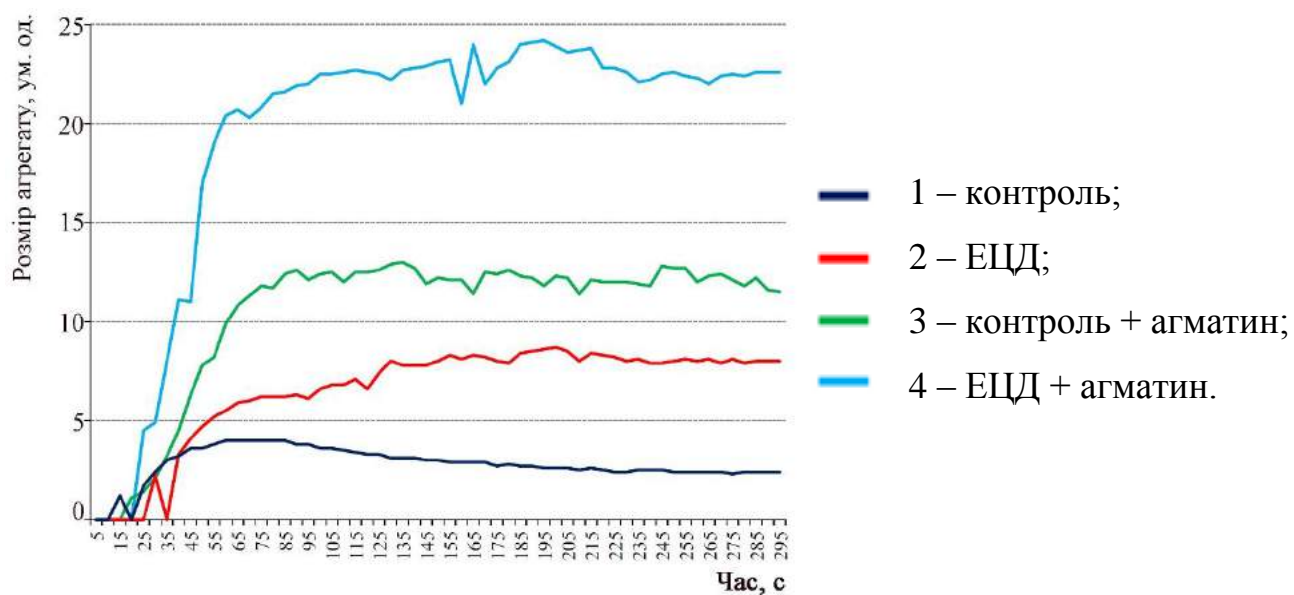


Рис. 3.7. Типові криві WGA-індукованої агрегації лейкоцитів щурів у контрольній групі, за умов експериментального цукрового діабету (ЦД) та на фоні введення агматину.

З урахуванням збільшення вмісту термінальних сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран лейкоцитів у тварин з ЕЦД на фоні введення агматину [27], отримані результати WGA-індукованої агрегації можна пояснити збільшення кількості саме  $\alpha$ -2,6-зв'язаних сіалових кислот у структурі олігосахаридних детермінант глікопротеїнів лейкоцитів тварин після введення даного поліаміну, оскільки сіалові кислоти, які приєднані ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3)-глікозидним зв'язком до субтермінальних цукрів у структурі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів набагато швидше піддаються гідролітичному відщепленню за участю сіалідаз, ніж ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6)-зв'язані залишки цих цукрів [27, 207].

### 3.3.1. Підсумки

Таким чином, підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що причиною зростання показників WGA-індукованої агрегації лейкоцитів тварин, яким вводили агматин є збільшення вмісту термінальних залишків N-

ацетил- $\beta$ ,D-глюкозаміну та сіалових кислот у складі мембранних глікокон'югатів лейкоцитів, що зумовлено посиленням процесу сіалювання олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів та послабленням десіалювання, а також прямою дією досліджуваного поліаміну на стан поверхневих глікокон'югатів мембрани лейкоцитів або на активність ферментів, які формують структуру вуглеводних детермінант адгезивних молекул цих клітин.

1. Бродяк І. В. Вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету / І. В. Бродяк, **І. І. Біла**, Н. О. Сибірна. Фізіологічний журнал. 2017. Т. 63, № 4. С. 48–55. (IF – 0.06, Scientific Journal Rankings – 0.130).

2. Сибірна Н. О. Вплив агматину на структурно-функціональний стан лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у щурів / Н. О. Сибірна, І. В. Бродяк, І. В. Ференц, **І. І. Біла** // XI Український біохімічний конгрес, 6–10 жовтня, 2014 р.: тези. – Український біохімічний журнал. 2014. Т. 86, № 5 (спеціальний випуск, додаток 2, 2014). С. 29–30.

#### **3.4. Дослідження процесів полімеризації-деполімеризації актину у лейкоцитах щурів для оцінки міграційної здатності імунокомпетентних клітин крові у всіх досліджуваних групах**

Морфофункціональний стан лейкоцитів узалежнений від комплексної взаємодії між білками мембрани і цитоскелетом, які задіяні в організації і координації сигнальних мереж, у забезпеченні специфічності та інтенсивності внутрішньоклітинного сигналювання [38]. Реорганізація актинового цитоскелету у результаті полімеризації-деполімеризації актину має важливе значення для здійснення локомоторних функцій лейкоцитів і є ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності лейкоцитів [158]. У разі дії стимулювальних чинників лейкоцити активуються, внаслідок чого відбувається швидка полімеризація актинових філаментів із наявних у клітині мономерів G-актину.

За рівнем флюоресценції Phalloidin-Alexa Fluor 350, який зв'язує F-актин у співвідношенні 1:1, не зв'язуючи при цьому G-актин [57], ми оцінили вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД, а також з'ясували як внутрішньом'язове введення агматину впродовж 14 днів впливає на процес полімеризації актину в лейкоцитах цих досліджуваних груп тварин. Оцифровані результати інтенсивності сигналів флюоресцентної мікроскопії на знімках представляють середнє арифметичне значення інтенсивності свічення клітин, яке виражали в у.о. (табл. 3.2, рис. 3.8).

Таблиця 3.2.

Вміст полімеризованого актину в лейкоцитах щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину

( $M \pm m$ ,  $n = 4-5$ )

Дослідні групи	Рівень F-актину (Умовні одиниці)
Контроль	$1,19 \pm 0.18$
Експериментальний цукровий діабет (ЕЦД)	$4,05 \pm 1.12^*$
Контроль + агматин	$0,98 \pm 0.11^*$
ЕЦД + агматин	$1,1 \pm 0.07^\#$

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

Порівняльний аналіз світлової та флюоресцентної мікроскопії дав змогу встановити, що на фотографіях більш інтенсивним свіченням та, відповідно, вищим вмістом F-актину характеризуються поліморфноядерні лейкоцити порівняно з мононуклеарними лейкоцитами. Полімеризовані актинові філаменти цитоскелету поліморфноядерних лейкоцитів беруть участь в міжклітинній

взаємодії (утворенні адгезивних контактів), передачі сигналів, визначають здатність клітини до міграції [172]. Вони сконцентровані у районі зовнішньої мембрани, відповідаючи за форму клітини і утворення виступів на поверхні клітини. F-актин локалізується у псевдоподіях, ламелоподіях, складках мембрани і актин-збагаченому кортексі клітини [112].

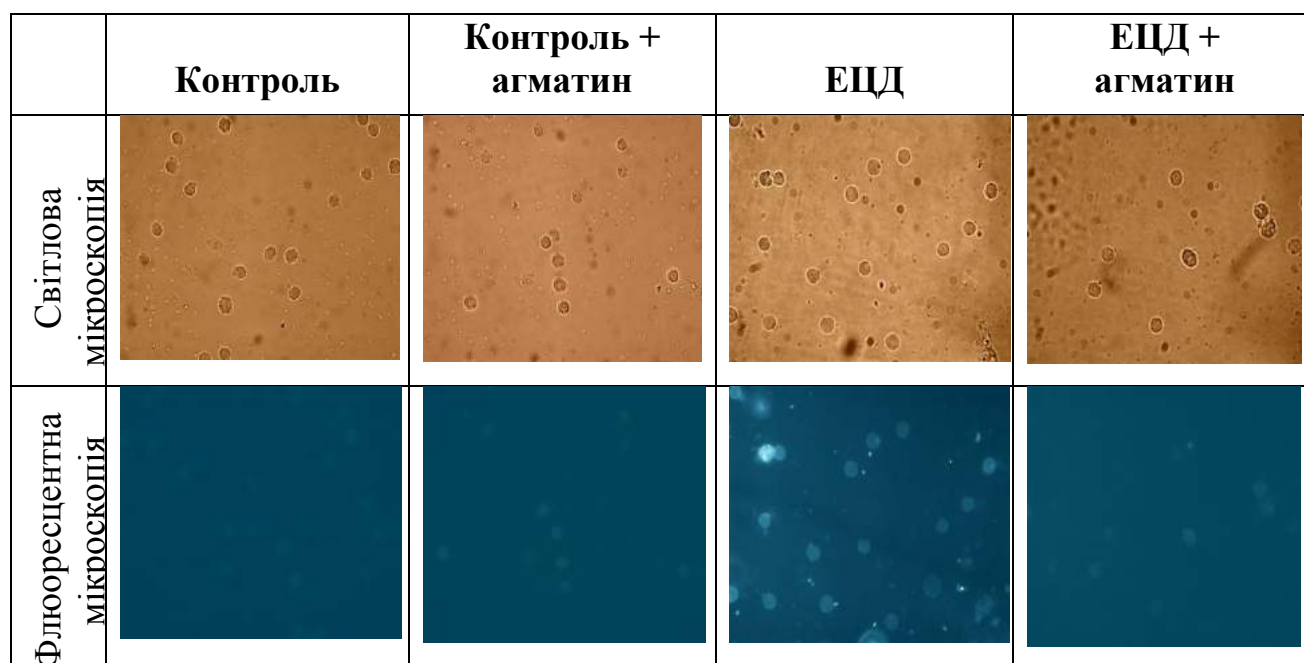


Рис. 3.8. Репрезентативні мікрофотографії світлової та флюоресцентної мікроскопії лейкоцитів демонструють інтенсивність свічення актину після фіксування, пермеабілізування та інкубування клітин з Phalloidin Alexa Fluor 350 в усіх досліджуваних групах тварин. Збільшення  $\times 1000$ .

Аналізуючи результати проведених досліджень (табл. 3.2), було встановлено, що вихідний рівень полімеризованого актину (не враховується G-актин, мономери актину) в лейкоцитах периферичної крові за ЕЦД був достовірно вищим порівняно з контрольною групою тварин, що вказує на їхній преактивованій стан і зміну структурно-функціональних властивостей цих клітин у разі діабету. Тобто за таких умов переважають процеси полімеризації, а деполімеризація сповільнена.

З метою корекції виявлених нами дефектів у рівні полімеризації актину в лейкоцитах крові у разі діабету було досліджено вплив агматину на вміст та

локалізацію F-актину в цих клітинах крові у контрольній групі щурів та за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету (табл. 3.2, рис. 3.8). За дії агматину у контрольній групі та у тварин з ЕЦД в лейкоцитах спостерігається зниження рівня полімеризованого актину. У разі застосування агматину лейкоцити у контрольній групі щурів характеризувалися округлою формою із локалізацією актинових філаментів у вигляді кортикального кільця.

За умов ЕЦД на фоні введення агматину вихідний рівень полімеризованого актину в лейкоцитах щурів достовірно знижувався порівняно з клітинами у разі діабету (табл. 3.2, рис. 3.8). Вміст F-актину становив  $1.1 \pm 0.07$  і  $4.05 \pm 1.12$  у.о., відповідно. Зменшення рівня полімеризованого актину при введенні агматину як у контролі, так і у тварин з ЕЦД може бути зумовлено як прямим, так і опосередкованим впливом цього поліаміну на функціональний стан клітин у руслі крові та на рівні гемопоезу. Оскільки, введення агматину призводить до підвищення секреції  $\beta$ -ендорфіну, який активує  $\mu$ -опіоїдні рецептори, що стимулює засвоєння глюкози периферичними тканинами, інтенсивність розвитку оксидативного стресу зменшується, що сприяє відновленню функціонального стану клітин.

Актин – білок, який існує у двох фізіологічних станах: мономерному глобулярному (G-актин) та полімерному або фібрилярному (F-актин). У клітинах F-актин представлений довгими мікрофіламентами (конститутивна фракція цитоскелету), які відходять від клітинної мембрани у напрямку до центру клітини, та короткими мікрофіламентами, які розташовуються у кортексі у підмембранній сітці. Короткі філаменти утворюють дуже динамічну фракцію, адже саме вони утворюються першими при ініціації полімеризації актинових філаментів мембрани (субкортикальний актин) у момент активації лейкоцитів і формування псевдоподій на їхній поверхні [112].

Для з'ясування молекулярних механізмів процесів 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. Клітини

лізували в Тритоні Х-100 і піддавали низькошвидкісному центрифугуванню (10 000 g, рис. 3.9, А).

У результаті було отримано дві фракції білків цитоскелету та цитозолу. Цитоскелетна фракція містила актинові філаменти цитоскелету, щільно асоційовані з мембраною – осад. Розчинна цитозольна фракція актину – надосадова рідина, містила короткі філаменти актину та мономерні актину. Імуноблот-аналіз актинових філаментів цитоскелету і фракції коротких актинових філаментів і мономерів актину дав змогу виразити величину загального вмісту актину в лейкоцитах кожної із досліджуваних груп (рис. 3.9, Б). Загальний вміст актину (сума показників при аналізі двох описаних вище фракцій, які були отримані у результаті першого центрифугування) у лейкоцитах контрольної групи тварин було прийнято за 100 %, з яким і порівнювали вміст загального актину в лейкоцитах інших експериментальних групах.

А

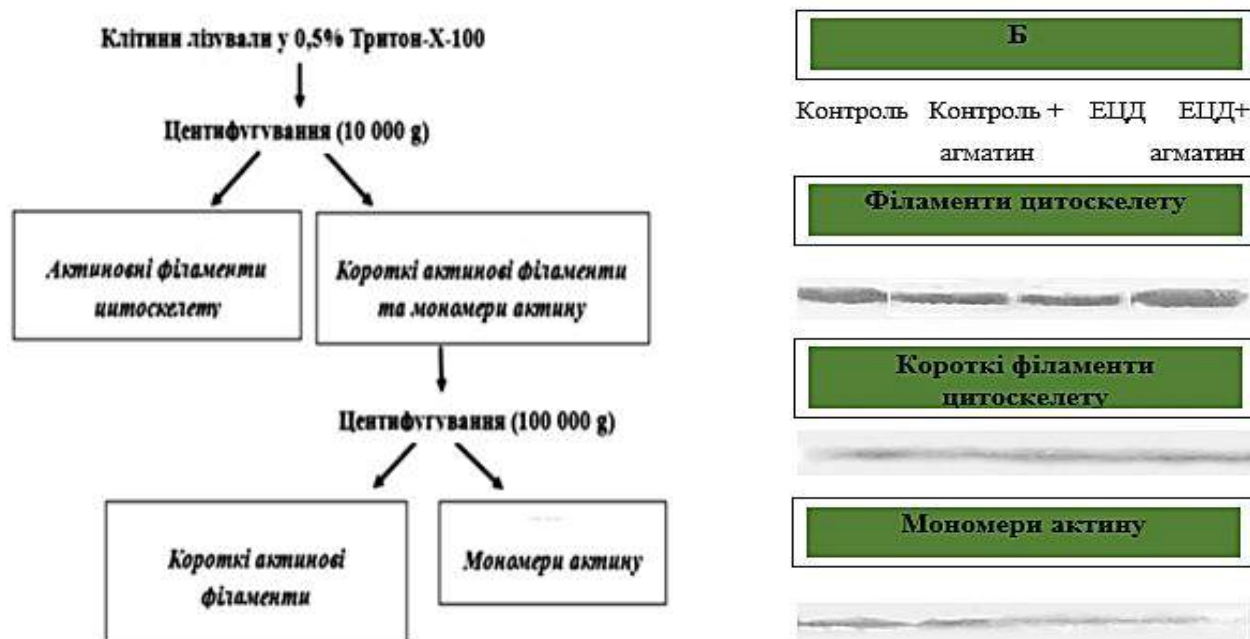


Рис. 3.9. Дослідження кількості актину різних фракцій методом імуноблот-аналізу в лейкоцитах щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину. А – схема фракціонування лізатів лейкоцитів, Б – імуноблот лізатів лейкоцитів досліджуваних груп.



У разі ЕЦД загальний вміст актину у 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. 3.10).

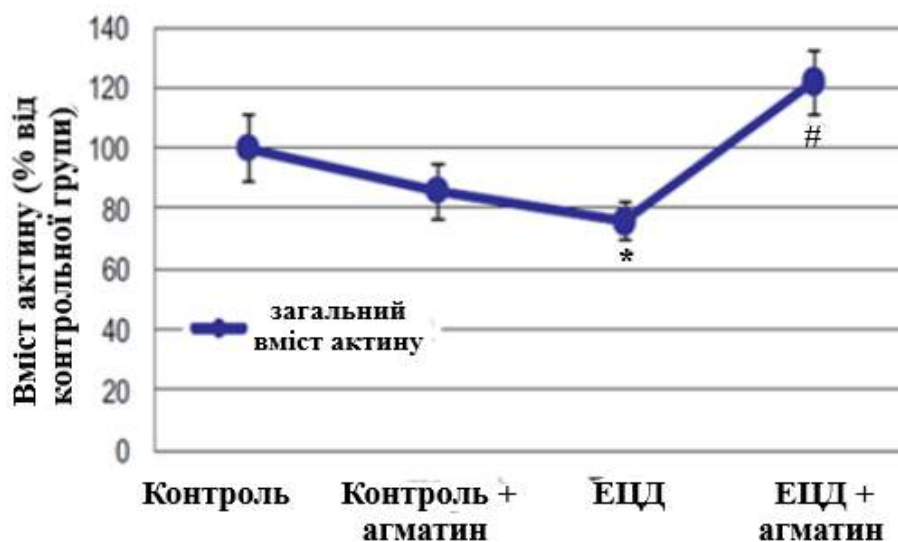


Рис. 3.10. Вміст загального актину (сума філаментів цитоскелету, коротких філаментів актину та мономерів актину) в лейкоцитах щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину (  $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів

\* достовірність відхилення від значень клітин контрольних щурів –  $P < 0,05$ ;

# достовірність відхилення від значень клітин щурів з ЦД –  $P < 0,05$

Як показано на рис. 3.9, А, подальше високошвидкісне центрифугування (при 100000 g) надосадової рідини, отриманої після низькошвидкісного центрифугування, дало змогу виділити дві фракції, які містили: короткі актинові філаменти і мономери актину.

Було проведено порівняльний аналіз перерозподілу актину (рис. 3.11) між фракціями довгих філаментів цитоскелету, коротких актинових філаментів і мономерами актину. У клітинах контрольної групи тварин ці три форми актину

розподілялися, як  $71,9 \pm 7,2 \%$ ,  $8,7 \pm 1,1\%$  і  $19,4 \pm 1,3 \%$ , відповідно. Отже, полімеризований актин домінує щодо мономерів актину у співвідношенні 8 : 2. В лейкоцитах тварин з ЕЦД актин розподілявся, як  $44,3 \pm 4,2 \%$  у фракції філаментів цитоскелету,  $44,3 \pm 4,4 \%$  формували короткі актинові філаменти і  $11,4 \pm 1,2 \%$  припадало на мономери актину. Тобто, вміст полімеризованого актину щодо мономерів актину співвідноситься як 9 : 1. Звертає на себе увагу зменшення вмісту фракцій філаментів цитоскелету із одночасним зростанням фракцій коротких актинових філаментів, що вказує на преактивований стан клітин.

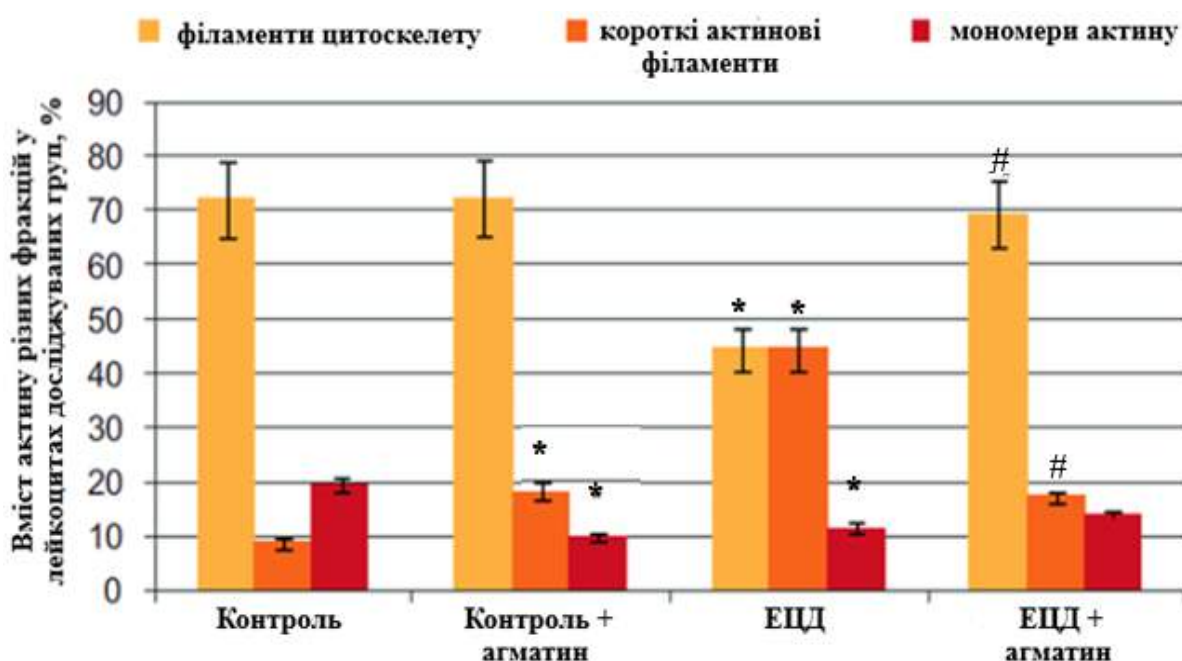


Рис. 3.11. Динаміка перерозподілу вмісту фракцій актину у лізатах лейкоцитів (що містили довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі актинові філаменти та мономери актину у нормі) за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину. Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів. Вміст актину виражений у відсотках від сумарного вмісту актину кожної окремої фракції (  $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ).

Дані одержані за допомогою денситометрії імуноблотів

\* достовірність відхилення від значень клітин контрольних щурів –  $P < 0,05$ ;

# достовірність відхилення від значень клітин щурів з ЦД –  $P < 0,05$ .

Після введення агматину контрольній групі щурів вміст актину у окремих фракціях лізатів лейкоцитів розподілявся як  $72,3 \pm 6,9$  % у фракції, яка містила щільно асоційовані з мембраною філаменти цитоскелету,  $17,9 \pm 1,5$  % формували короткі актинові філаменти і  $9,8 \pm 0,8$  % припадало на мономери актину (рис. 3.10).

Введення агматину тваринам з ЕЦД призводило до перерозподілу цих трьох фракцій актину у такому відсотковому співвідношенні –  $69,3 \pm 6,6$ ,  $17,1 \pm 1,6$  і  $13,6 \pm 1,1$  %. Отже, у двох досліджуваних групах полімеризований актин домінує щодо мономерів актину: у контрольній групі тварин – у співвідношенні 9 : 1, у хворих тварин – у співвідношенні 8,5 : 1,5 (рис. 3.11).

### 3.4.1. Підсумки

Методами флюоресцентної мікроскопії та імуноблот-аналізу встановлено зростання вмісту 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. Зміна рівня полімеризації та деполімеризації актину в лейкоцитах у разі ЕЦД може вказувати на порушення у системі активації, хемотаксису, міграції та фагоцитозу, адже саме актиновий цитоскелет лейкоцита постійно реорганізується, виступаючи динамічною системою, яка визначає морфофункціональні зміни у клітині. Доведено коригуючий ефект агматину на функціональний стан лейкоцитів, що підтверджується інтенсифікацією процесу формування довгих філаментів актинового цитоскелету.

1. Brodyak I. V. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats / I. V. Brodyak, **I. I. Bila**, M. Overchuk, N. O. Sybirna. *Studia Biologica*. 2014. Т. 8, № 3–4. С. 17–30.

2. Brodyak I. V. The dynamics of actin filament polymerization in activated leukocytes under experimental diabetes mellitus against the background of agmatine administration rats / I. V. Brodyak, **I. I. Bila**, N. O. Sybirna. *Biopolymers and Cell*. 2017. Vol. 33, № 6. P. 403–414. (Scopus, SJR = 0.417).

3. **Bila I.** Agmatine effect on actin polymerization in leukocytes of diabetic rats / I. Bila, M. Overchuk, I. Brodyak, N. Sybirna // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17–20 вересня 2014 р.: збірник тез. Ужгород, 2014. С. 14.

4. Overchuk M. Agmatine administration normalizes actin polymerization levels and inhibits leukocyte apoptosis in rats with diabetes mellitus / M. Overchuk, I. Brodyak, I. Ferents, **I. Bila**, N. Klymyshyn, N. Sybirna // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 20–23 квітня 2015 р. : збірник тез. Львів, 2015. С. 84–85.

### **3.5. Вплив агматину на трансдукцію лектиніндукованих сигналів через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів щурів у нормі та за умов ЕЦД, які викликають реорганізацію структурних елементів цитоскелету лейкоцитів**

Трансдукція лектиніндукованого сигналу через глікокон'югати, кількість і структура яких на поверхні лейкоцитів за умов діабету є зміненою [27], призводить до порушень у процесах полімеризації-деполімеризації актинового цитоскелету [51]. З метою з'ясування змін у системі адгезивних взаємодій типу клітина-матрикс чи клітина-клітина, ми проводили преінкубацію лейкоцитів із лектином WGA. У проведення WGA-стимульовального сигналу в лейкоцити задіяні рецептори, які у термінальній позиції олігосахаридних ланцюгів поверхневих глікокон'югатів містять сіалові кислоти. З літературних даних відомо, що введення агматину тваринам з ЦД зумовлює збільшення кількості сіалоглікокон'югатів і залишків N-ацетил-D-глюкозаміну у складі поверхневих гліканів лейкоцитів, внаслідок чого відновлюється афінність зв'язування лектину

WGA з його комплементарними лігандами [52]. 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 і його деполімеризацію на 3 хв (рис. 3.12, 3.14).

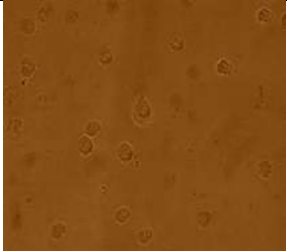

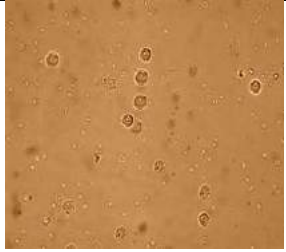

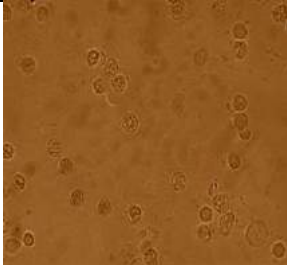
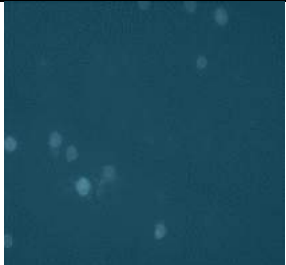


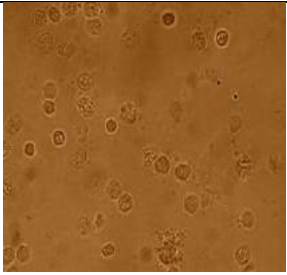

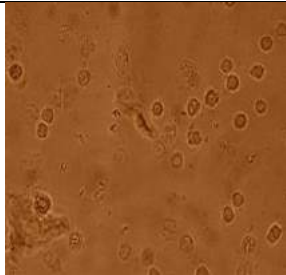

		Контроль		ЕЦД	
WGA, час стимулювання	Мікроскопія				
	Світлова	Флюоресцентна	Світлова	Флюоресцентна	
0,5 хв					
1 хв					
3 хв					

Рис. 3.12. Інтенсивність свічення актину 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 експериментальним цукровим діабетом. Збільшення у 1 000 разів.

У лейкоцитах тварин за умов ЦД низька амплітуда полімеризації актину (рис. 3.12, 3.14) вказує на довготривале не сприйняття активаційних сигналів від лектину WGA через сіаловмісні глікокон'югати. У разі діабету підвищений вміст глюкози виявляє інгібувальну дію на ензими, які задіяні у біосинтезі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів [142]. Одним з таких ензимів є сіалілтрансфераза, яка каталізує приєднання сіалової кислоти до субтермінального цукру у структурі глікану [207].

На фоні введення агматину у лейкоцитах контрольної групи тварин відсоток F-актину становив  $350 \pm 41$ ,  $400 \pm 46$  і  $320 \pm 31$  % на 0,5, 1 і 3-ю хв стимулювання сіалоспецифічним лектином WGA, відповідно. Така динаміка полімеризації актину вказує на формування піка полімеризації F-актину на 1-у хв стимулювання лектином WGA. Високі значення F-актину на 3-ій хв після дії лектину WGA (рис. 3.13, 3.14) свідчать про порушення процесу деполімеризації актину.

Ми спостерігаємо нетипово пролонгований час полімеризації. Такі зміни, можливо, зумовлені порушенням трансдукції сигналу через сіалоглікокон'югати, які у термінальних позиціях містять меншу кількість  $\alpha$ 2,3-зв'язаних залишків сіалових кислот.

На відміну від цього, в діабетичній групі на фоні введення агматину відсоток F-актину становив  $620 \pm 59$ ,  $260 \pm 28$  і  $160 \pm 15$  % на 0,5, 1 і 3 хв після преінкубації лейкоцитів з сіалоспецифічним лектином WGA відповідно (рис. 3.13, 3.14).

Така динаміка формування піка полімеризації актину вже на 0,5 хв стимулювання лектином WGA і дуже стрімкий процес деполімеризації на 1 хв після дії лектину вказують 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 [27].

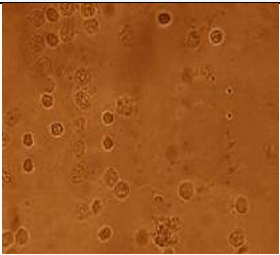

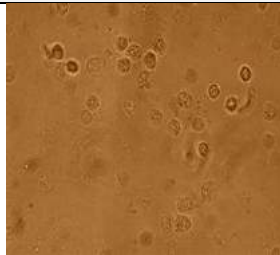

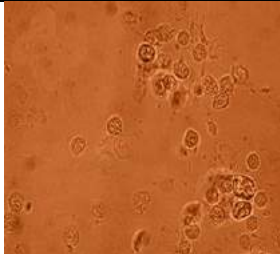
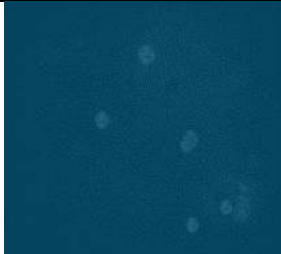
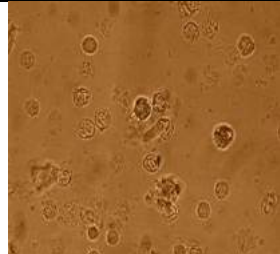

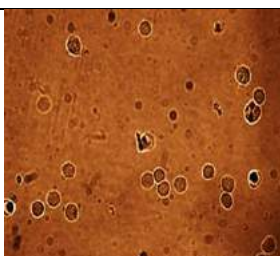

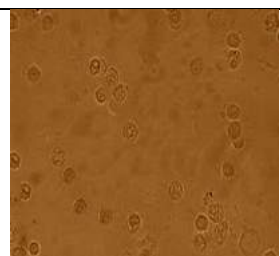

	Контроль+агматин		ЕЦД+агматин	
WGA, час стимулювання	Мікроскопія			
	Світлова	Флюоресцентна	Світлова	Флюоресцентна
30 с				
1 хв				
3 хв				

Рис. 3.13. Інтенсивність свічення актину 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, щурів з експериментальним цукровим діабетом та на фоні введення агматину. Збільшення у 1000 разів.

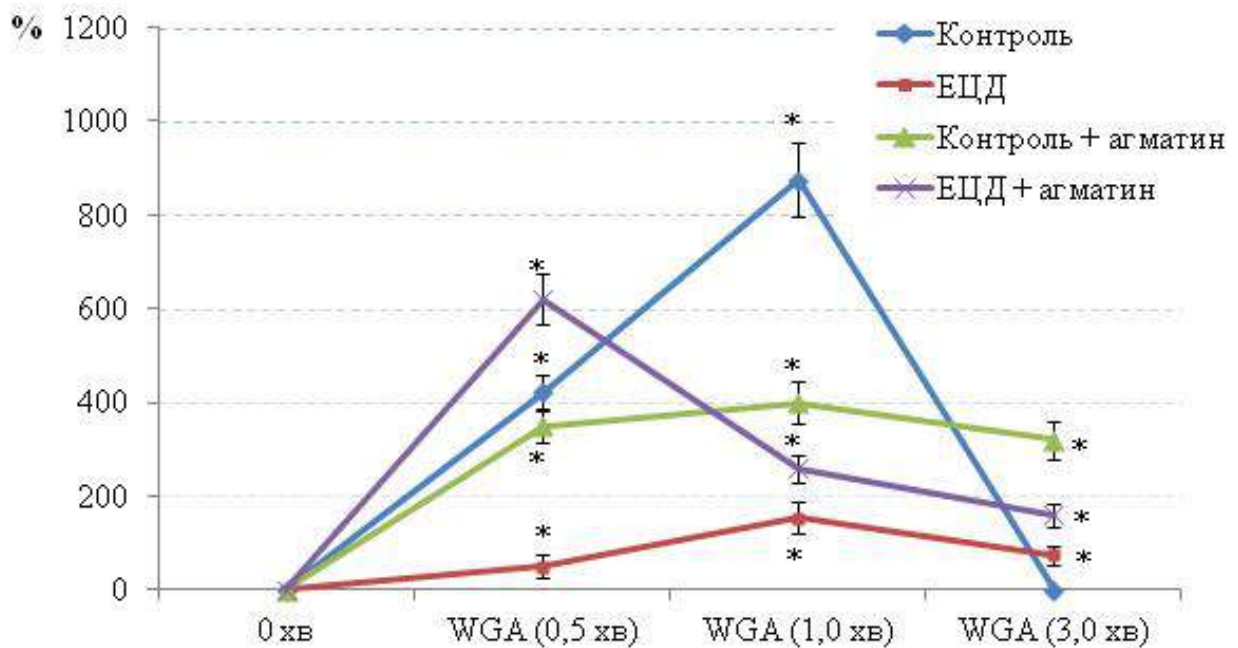


Рис. 3.14. Динаміка полімеризації актину в лейкоцитах у стані спокою (0 хв) і у стані активації (після преінкубації із сіалоспецифічним лектином WGA впродовж 0,5, 1 і 3 хв) контрольних тварин і щурів з цукровим діабетом (ЦД) на фоні введення агматину. Часові точки вказують відсоток F-актину відносно його вмісту в лейкоцитах у стані спокою, який прийнято за 0 %.

*Примітка:* \*  $P < 0,05$  відносно лейкоцитів у стані спокою

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. 3.15, А–Г). В клітинах контрольної групи тварин ці три форми актину розподілялися, як  $72 \pm 7 \%$ ,  $9 \pm 2 \%$  і  $20 \pm 3 \%$ , відповідно (рис. 3.15, А).

У лейкоцитах контрольної групи тварин на 0,5 хв стимулювання лектином WGA (рис. 3.15, Б) відсоток полімеризованого актину, представленого філаментами цитоскелету, знизився на 18 %, проте вміст фракції коротких актинових філаментів збільшився на 20 %.



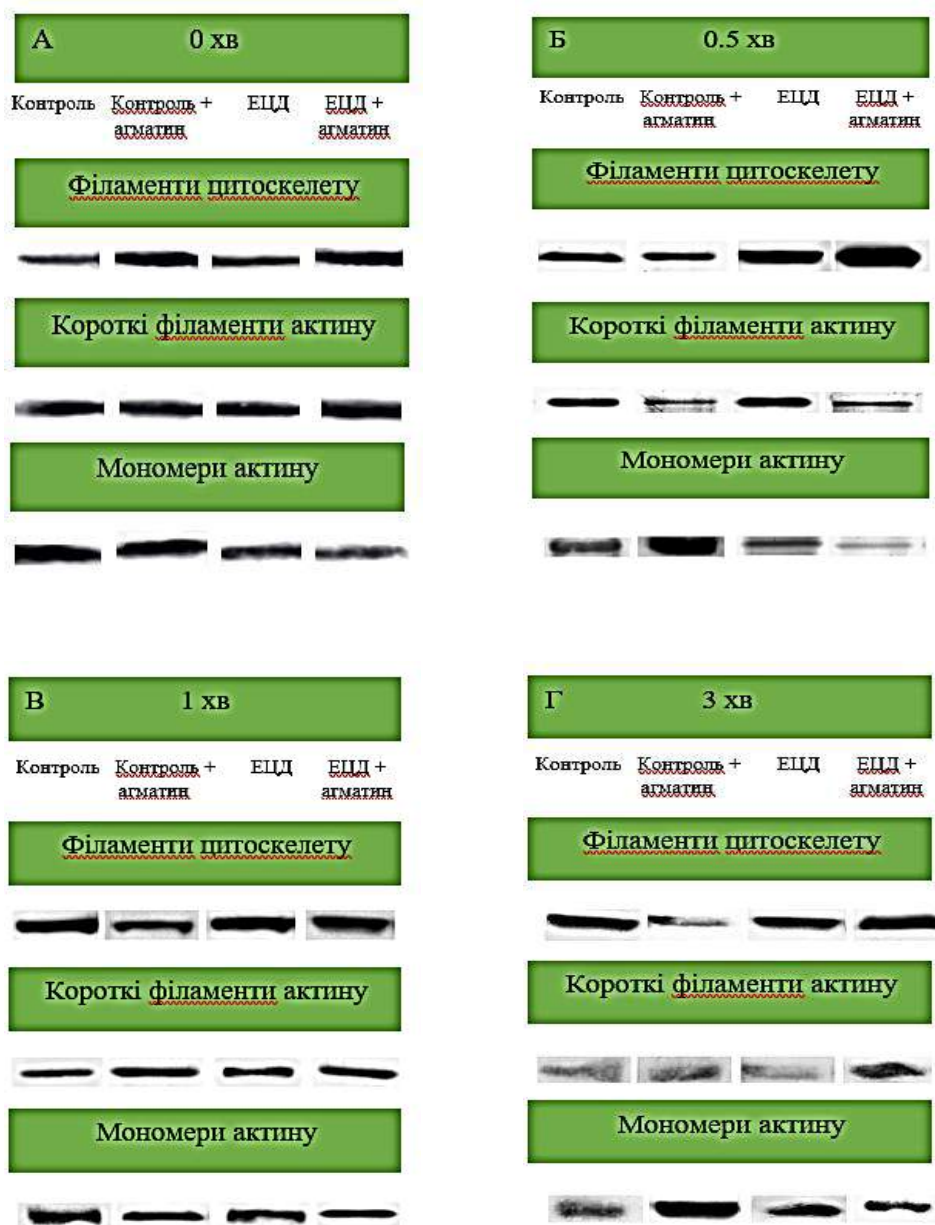


Рис. 3.15. Дослідження рівня різних фракцій актину методом імуноблот-аналізу в лейкоцитах щурів контрольної групи, за умов експериментального цукрового діабету та після введення аргатину. А – імуноблот лізатів лейкоцитів, активованих лектином WGA способом преінкубації впродовж 0 хв; Б – імуноблот лізатів лейкоцитів, активованих лектином WGA способом преінкубації впродовж 0,5 хв; В – імуноблот лізатів лейкоцитів, активованих лектином WGA способом преінкубації впродовж 1 хв; Г – імуноблот лізатів лейкоцитів, активованих лектином WGA способом преінкубації впродовж 3 хв. Рівні аліквоти кожної фракції вносили в гель. В одну лунку гелю вносили білки після лізису  $1,5 \times 10^6$  клітин.

На 1 хв після дії лектину WGA ми спостерігали прямо протилежний ефект: фракція філаментів цитоскелету зросла до 70 %, а короткі актинові філаменти становили лише 9 % полімеризованого актину. Рівень мономерів актину в лейкоцитах на 0,5 і 1 хв впливу лектину не зазнавав достовірних змін. На 3 хв після дії лектину WGA F-актинова фракція коротких актинових філаментів лейкоцитів зросла з 9 % до 15 %, що корелювало зі зниженням вмісту G-актину на фоні незміненого рівня актину філаментів цитоскелету. 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. 3.16, А).

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на 0,5 хв стимулювання лектином WGA актин розподілявся, як  $66 \pm 5$  % у фракції філаментів цитоскелету,  $25 \pm 2$  % формували короткі актинові філаменти і  $9 \pm 1$  % припадало на мономер актину (рис. 3.16, В). Отримані результати вказують на те, що за умов ЕЦД стимулювальний ефект лектину WGA приводить до інтенсифікування процесу полімеризації актину у фракції філаментів цитоскелету лейкоцитів внаслідок деполімеризації актину коротких філаментів. Вміст актинових мономерів за цих умов не змінювався.

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. 3.16, В).

У лейкоцитах контрольної групи тварин на фоні введення агматину на 0,5 хв стимулювання лектином WGA відсоток полімеризованого актину, представленого філаментами цитоскелету і короткими актиновими філаментами, знизився на 50 % та 11 %, відповідно. Такий інтенсивний процес деполімеризації призвів до різкого зростання рівня G-актину – з 10 % у неактивному стані до 72 % у стані активації лейкоцитів лектином WGA впродовж тридцяти секунд.

На 1 хв після дії лектину WGA ми спостерігали прямо протилежний ефект – інтенсивний процес полімеризації актину зумовив підвищення F-актинової фракції філаментів цитоскелету до 45 %, а фракції коротких актинових філаментів до 20 %.

Рівень мономерів актину в лейкоцитах на 1 хв впливу лектину WGA знизився у 2 рази, порівняно з рівнем мономерів актину лейкоцитів без стимулювання. На 3 хв після дії лектину WGA рівень F-актинових філаментів цитоскелету лейкоцитів знизився до 7 %, що корелювало зі зростанням вмісту G-актину майже до 80 %. (рис. 3.16, Б). Отже, динаміка перерозподілу вмісту актину у цій групі тварин свідчить, що основні зміни в активованих лейкоцитах відбуваються у філаментах цитоскелету, корелюючи зі зміною вмісту мономерів актину.

Після 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 призводить до інтенсифікування процесу полімеризації актину у фракції філаментів цитоскелету лейкоцитів внаслідок деполімеризації актину коротких філаментів і використання мономерів актину (рис. 3.16, Г).

На 1 хв після дії лектину WGA рівень F-актину у філаментах цитоскелету лейкоцитів знизився на 40 %, що корелювало зі зростанням вмісту G-актину до 30 % та F-актину коротких актинових філаментів до 20 %. На 3 хв стимулювання лектином WGA у лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину актин перерозподілявся між трьома фракціями у такому відсотковому співвідношенні –  $67 \pm 8$ ,  $23 \pm 3$  і  $10 \pm 1$ , досягаючи рівня показників у неактивному стані (рис. 3.16, Г).

◆ Філаменти цитоскелету     ■ Короткі актинові філаменти     ▲ Мономери актину

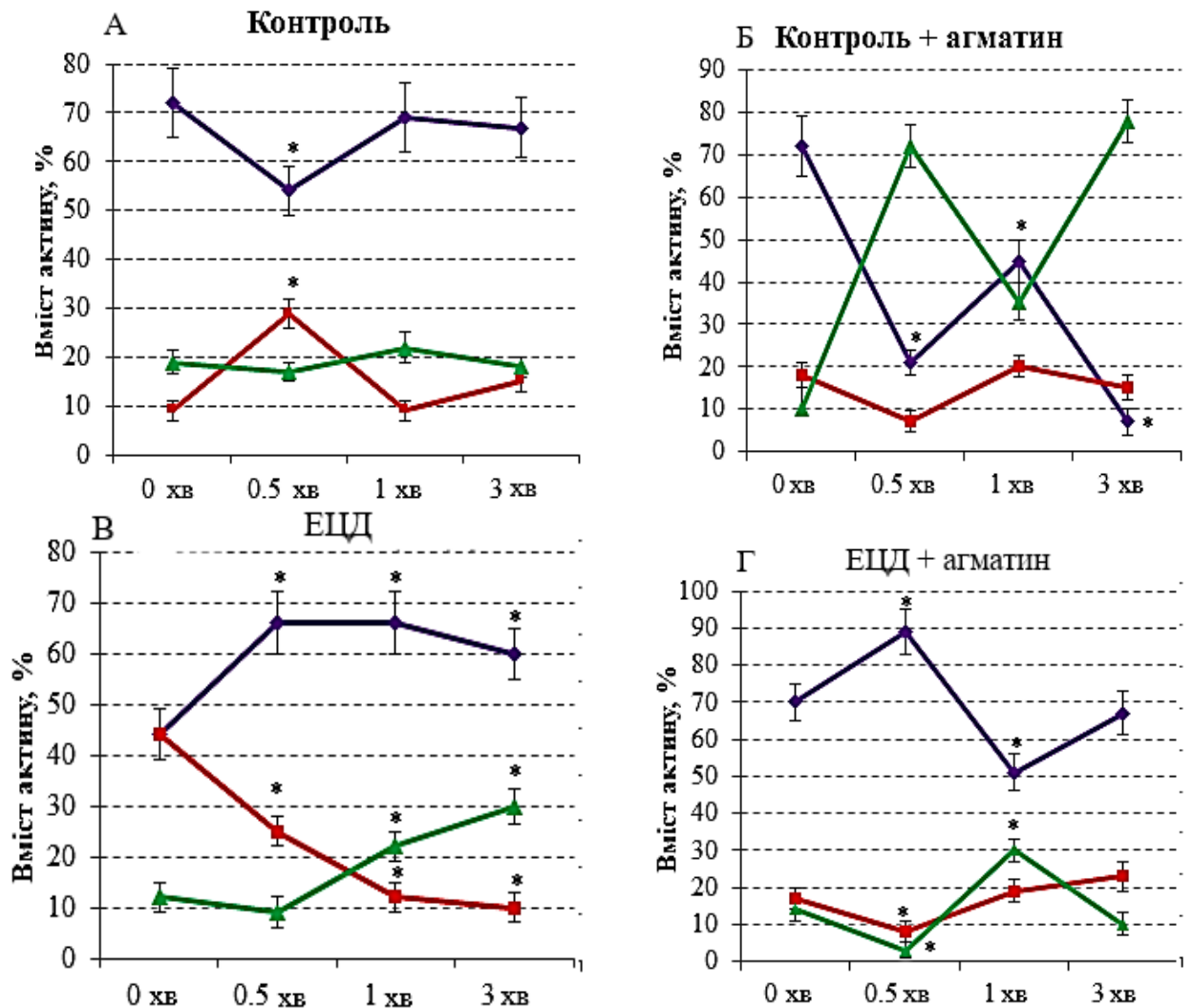


Рис. 3.16. Динаміка перерозподілу вмісту фракцій актину у лізатах лейкоцитів, що містили довгі актинові філаменти цитоскелету, короткі актинові філаменти та мономери актину, у стані спокою (0 хв) і у стані активації (після преінкубації із лектином WGA впродовж тридцяти секунд, однієї і трьох хвилин) 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).

\* достовірність відхилення від значень у неактивному стані (0 хв) –  $P < 0,05$ .

Результати, отримані різними методичними прийомами (флюоресцентна мікроскопія та імуноблот-аналіз), свідчать, що агматин впливає на функціональний стан лейкоцитів через процеси формування елементів цитоскелету лейкоцитів периферичної крові щурів за умов ЕЦД.

### 3.5.1. Підсумки

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину динаміка формування відповіді на стимулювальний вплив лектину WGA характеризувалася інтенсифікуванням полімеризації актину фракції філаментів цитоскелету вже на 0,5 хв впливу лектину, дуже стрімким процесом деполімеризації на 1 хв після дії лектину та повернення показників до рівня у вихідному стані у разі дії лектину впродовж 3 хв. За вказаних умов у лейкоцитах афінність зв'язування сіалоглікокон'югатів із комплементарними лігандами та трансдукція лектиніндукованого сигналу, який обумовлює реорганізацію актинового цитоскелету, майже досягають показників реорганізації актину в активованих лейкоцитах контрольної групи тварин. Отримані результати свідчать, що агматин позитивно впливає на функціональний стан лейкоцитів тварин з ЕЦД. Ймовірно, нормалізація рівня глюкози у тварин з ЕЦД у відповідь на введення агматину є одним з механізмів, який опосередковує такі функціональні зміни в лейкоцитах за умов ЕЦД.

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 структури поверхневих глікокон'югатів, що відповідають за формування функціональної відповіді лейкоцитів на активаційні сигнали.

1. Бродяк І. В. Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актину лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету /

І. В. Бродяк, **І. І. Біла**, Н. О. Сибірна. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016. Вип. 73. – С. 35–40.

2. Бродяк І. В. Вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету / І. В. Бродяк, **І. І. Біла**, Н. О. Сибірна. *Фізіологічний журнал*. 2017. Т. 63, № 4. С. 48–55. (IF – 0.06, Scientific Journal Rankings – 0.130).

3. **Біла І.** Динаміка полімеризації актинових філаментів лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у разі стимулювання лектином WGA / І. Біла, І. Бродяк, Н. Сибірна // Актуальні проблеми сучасної біохімії, присвяченій до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова, 16–18 листопада 2016 р. : Вісник Львівського університету. Серія біологічна, випуск 73. Львів, 2016. С. 114.

4. **Біла І.** Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актинового цитоскелету в лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину / І. Біла, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 25–27 квітня 2017 р. : збірник тез. Львів, 2017. С. 224–225.

5. Brodyak I. Effect of agmatine on actin reorganization in WGA-stimulated leukocytes under experimental diabetes mellitus / I. Brodyak, M. Sabadashka, **I. Bila**, N. Sybirna // 7<sup>th</sup> International Weigl Conference, September 26–29, 2017: Abstracts. Lviv, 2017. P. 148.

6. **Біла І.** Динаміка зміни вмісту мономерного актину в активованих лейкоцитах тварин з експериментальним цукровим діабетом на фоні введення агматину / І. Біла, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 10–12 квітня 2018 р. : збірник тез. Львів. 2018. С. 88–89.

## РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Цукровий діабет 1-го типу характеризується прогресуючою аутоімунною деструкцією  $\beta$ -клітин підшлункової залози, внаслідок чого виникає дефіцит інсуліну та хронічна гіперглікемія [102]. За умов гіперглікемії активується декілька шляхів метаболізму глюкози: аутоокиснення глюкози та її метаболічних інтермедіатів з утворенням метилгліоксалу, гліоксалу і 3-дезоксиглюкозону, які зумовлюють неферментативне глікозилювання білків; гексозаміновий шлях утилізації глюкози з утворенням уридинфосфат-N-ацетилглюкозаміну, який теж бере участь у глікозилюванні білків за залишками серину і треоніну; обмін сорбітолу, що призводить до генерування вільних радикалів і зниження вмісту відновленого глутатіону (GSH); окисне фосфорилування з інтенсифікацією функції електронно-транспортного ланцюга мітохондрій [13, 53, 121, 145, 212]. Мембранний потенціал зростає і електрон із коензиму Q переноситься на молекулярний кисень з утворенням радикала супероксид-аніона ( $O_2^{\bullet-}$ ). Пригнічення гліколізу призводить до накопичення тріозофосфатів, які спричиняють утворення карбонільних сполук, що беруть участь в окисній модифікації білків, ліпідів і ДНК. Окисна модифікація білків призводить до активації протеолізу, посилюючи деструктивні процеси і запалення, пошкодження ДНК, порушення функцій білків-транспортів, зміну активності АТФ-ази та спричиняють порушення каскаду дихального ланцюга. Окрім того, глюкоза та її метаболіти за наявності  $Fe^{3+}$  і  $Cu^{2+}$  реагують з гідроген пероксидом ( $H_2O_2$ ) з утворенням гідроксильного радикала ( $\bullet OH$ ), що поглиблює процеси окисної деструкції макромолекул, розриваючи будь-які C–H та C–C зв'язки [9, 61]. Аутоокиснення глюкози та неферментативне глікозилювання аміногруп білків і фосфоліпідів призводить до акумулювання кінцевих продуктів обміну, які погано елімінуються і тривало циркулюють у крові [103]. Вони теж є джерелом активних форм кисню, оскільки імітують властивості металовмісних окисних систем. Надмірне утворення АФО ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $H_2O_2$ ) й активних форм нітрогену (АФН) – ( $NO$ ,  $ONOO^-$ ) призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу [13, 121,

196]. Тому ЦД завжди характеризується інтенсивним вільнорадикальним окисненням біосубстратів [36]. Одночасно за діабету відбувається виснаження антиоксидантних захисних механізмів [195]. Спостерігається зниження рівня GSH й активності ензимів антиоксидантного захисту: глутатіонпероксидази (ГП), супероксиддисмутази (СОД), каталази, нікотинамідаденіндинуклеотидфосфатази й інших [90, 123, 145, 149]. Усі ці зміни створюють сприятливі передумови для формування атеросклеротичних, мікро- і макросудинних діабетичних ускладнень [167, 169, 196].

Розвиток оксидативно-нітративного стресу в клітинах периферичної крові за умов ЦД може попередити агматин (4-амінобутил-гуанідин) – продукт декарбоксілювання L-аргініну [81, 82, 164]. Відмінною особливістю агматину порівняно з іншими цукрознижувальними агентами є те, що однією з його фізіологічних функцій є здатність виконувати роль ендogenous інгібітора синтази оксиду азоту (NOS) [43, 116, 81]. Оскільки агматин, як і L-аргінін, містить у своїй структурі гуанідинову групу, він виконує роль конкурентного інгібітора NOS ( $K_i = 660$  мкМ для nNOS, 220 мкМ для iNOS і 7,5 мМ для eNOS). Виявляючи найсильнішу інгібувальну дію на активність iNOS, цей амін може бути ендogenous регулятором продукування оксиду нітрогену iNOS у лейкоцитах під час їхньої активації та прояву функціональної активності у нормі та за умов патологій різної етіології. Тому в клітинах, які експресують гени конститутивної чи індукційної ізоформ NOS, наявна аргініндекарбоксилаза, котра каталізує перетворення L-аргініну в агматин, а також агматиназа – ензим деградації агматину [86, 177].

Одним із основних джерел АФО в організмі є лейкоцити. Нейтрофіли і макрофаги продукують АФО під час знешкодження антигенів [66]. АФО залучені у процеси посилення адгезивної здатності лейкоцитів, беруть участь у вазорегуляції та проліферації фібробластів. У лейкоцитах АФО стимулюють гени, які кодують фактори транскрипції, диференціації та антиоксидантні ензими [30, 92, 99]. За умов ЦД джерелом АФО є кінцеві продукти глікації (AGEs), які



стимулюють утворення великої кількості прозапальних цитокінів (ТНФ $\alpha$ , ІЛ-2, ІЛ-6 та ін.) [3, 58, 201, 198 ].

За умов досліджуваної патології лейкоцити циркулюють у крові в субактивованому стані [206]. Після активації лейкоцитів протягом секунд рівень продукції АФО у них збільшується у понад 100 разів внаслідок роботи НАДФН-оксидази. Цей ензим каталізує відновлення молекулярного кисню до  $O_2^{\bullet-}$ . Супероксид-аніон вступає у реакцію з NO з високою швидкістю, утричі вищою, ніж у реакцію із СОД. Тому в лейкоцитах з великою ймовірністю відбувається взаємодія між  $O_2^{\bullet-}$  і утворення NO [192, 208]. За ЦД в умовах порушення рівноваги в бік  $O_2^{\bullet-}$  та надпродукції оксиду нітрогену це призводить до інтенсивного утворення цитотоксичного  $ONOO^-$  у лейкоцитах, який провокує розвиток ПОЛ, посилює процес оксидації сульфгідрильних груп і обумовлює пошкодження ДНК. [118, 101].

За умов ЦД високий вміст глюкози в крові та розвиток оксидативного стресу корелює з підвищеним рівнем ПОЛ [215, 224]. Внаслідок дії АФО на ліпиди плазматичних мембран утворюються ліпідні радикали ( $L\bullet$ ), які за наявності кисню здатні генерувати високотоксичні радикали ліпопероксидів ( $LOO\bullet$ ), котрі чинять токсичний вплив на клітини [143]. Біомаркером інтенсивності ПОЛ є вміст ТБК-позитивних продуктів. Підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах крові тварин з ЦД свідчить про активацію процесів ліпопероксидації за моделювання досліджуваної патології. Внаслідок ПОЛ порушення структурно-функціональної цілісності мембран лейкоцитів зумовлює зниження мембранного потенціалу, зміни трансмембранної фосфоліпідної асиметрії, активності мембранозв'язаних ензимів, рецепторів і транспортних білків, зниження регуляторного впливу гормонів і медіаторів [91, 166]. У результаті змінюється функціональна активність клітин крові, що є основою ускладнень за ЦД [215]. Введення агматину тваринам з діабетом призводило до зниження інтенсивності накопичення продуктів ліпопероксидації у лейкоцитах. Такий ефект досліджуваного поліаміну зумовлений його гіпоглікемічними властивостями [116]. У тварин з ЦД за введення агматину концентрація глюкози у периферичній

крові знижувалася з 17,6 мМ до рівня фізіологічної норми – 4,9 мМ, що було показано у результаті проведених досліджень. За цих умов не відбувається надпродукції супероксид-аніона, джерелом якого є НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза, продукти глікації, аутоокиснення глюкози [81, 226].

За умов ЦД інтенсивність оксидативно-нітративного стресу та ПОЛ залежить від багатьох чинників, зокрема детермінується функціонуванням ензимів системи антиоксидантного захисту [13, 84, 118]. Ключовим і найпотужнішим антиоксидантом першої лінії системи захисту від АФО є СОД. У цитозолі локалізується Cu-Zn-СОД, а у мітохондріях – Mn-СОД. Цей ензим каталізує реакцію дисмутації двох молекул  $O_2^{\cdot-}$  з утворенням  $H_2O_2$  і  $O_2$ , які є менш токсичними для організму [118]. Утворений гідроген пероксид є субстратом для декількох внутрішньоклітинних ензимів. Каталаза, яка локалізується в пероксисомах, каталізує розщеплення  $H_2O_2$  до води і молекулярного кисню, а глутатіонпероксидаза – до  $H_2O$ . Донором гідрогену в цій реакції є відновлений глутатіон:  $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ . Окиснений глутатіон (GSSG) зазнає відновлення НАДФН-залежною глутатіонредуктазою (ГР). Утворений НАДФ<sup>+</sup> відновлюється у першій і третій реакціях пентозофосфатного шунта, а також у ланцюзі цитохромів і за рахунок природних антиоксидантів –  $\alpha$ -токоферолу, аскорбінової кислоти, флавоноїдів [91].

У результаті проведених експериментальних досліджень було встановлено, що у лейкоцитах крові щурів за умов ЦД активність ензимів системи антиоксидантного захисту достовірно знижується. Отримані нами зміни щодо активності ензимів антиоксидантного захисту узгоджуються із результатами інших дослідників [10, 41, 108, 114, 194]. Зниження активності досліджуваних ензимів може бути зумовлене зниженням експресії їхніх генів [170] та процесами оксидації, глікації і нітрування протеїнових молекул, які негативно впливають на їхню структуру і функціональні властивості. Нітрування супроводжується зміною значення  $pK_a$  гідроксильної групи тирозину, що призводить до надання залишку нітрованого тирозину негативного заряду за фізіологічних значень рН, змінюючи структурні властивості протеїнів, а у випадку ензимів – їхню каталітичну

активність [190]. За умов ЦД в лейкоцитах значно підвищується вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів [82]. Зокрема, яскравим прикладом втрати ензиматичної активності, пов'язаної з посттрансляційним нітруванням за залишками тирозину *in vivo*, є мітохондріальний ензим Mn-SOD [131]. Як наслідок, зниження активності SOD спричиняє збільшення вмісту в лейкоцитах  $O_2^{\cdot-}$ , який інактивує глутатіонредуктазу. Отже, за умов діабету порушення взаємної та кооперативної роботи, спричинене зниженням активності хоча б одного з антиоксидантних ензимів внаслідок порушення їхньої структури, призводить до змін у роботі всієї системи антиоксидантного захисту [225, 118]. Зниження концентрації GSH у лейкоцитах крові щурів з ЦД є додатковим показником, який підтверджує розвиток оксидативного стресу та порушення редокс-гомеостазу на клітинному рівні [140, 179].

Отримані експериментальні дані підтверджують неспроможність антиоксидантної системи лейкоцитів реалізувати у повному обсязі захисні й адаптивні механізми у разі оксидативно-нітративного стресу, який виникає за досліджуваної патології.

Введення агматину тваринам з ЦД зумовлювало підвищення активності SOD, каталази і ГПО. Проявляючи гіпоглікемічний ефект, агматин опосередковано обумовлює відновлення активності флавопротеїнових оксидаз (ксантинооксидази, глюкозооксидази, моноамінооксидази) до меж фізіологічної норми, які у процесі біологічного окиснення утворюють гідроген пероксид [145]. У цих умовах у лейкоцитах значно зростає активність SOD, яка підтримує концентрацію гідроген пероксиду на базовому рівні для прояву антибактерицидних властивостей цих клітин крові. Надпродукція гідроген пероксиду може пошкоджувати структуру молекул SOD. Тому в антиоксидантний захист лейкоцитів тварин з ЕЦД після введення агматину залучаються інші ензими – ГПО та каталаза, які розщеплюють гідроген пероксид. У зв'язку з цим, активність SOD та каталази / ГПО взаємопов'язані між собою, а рівень одного ензиму впливає на рівень іншого [118].

Введення агматину тваринам з ЕЦД обумовлювало підвищення вмісту GSH. Такі зміни можна пояснити зростанням активності ГР (на 72 % порівняно з ЕЦД), яка каталізує реакцію відновлення глутатіону, який безпосередньо інактивує АФО, попереджаючи утворення високотоксичного пероксинітриду [182, 140]. У результаті зниження концентрації  $\text{ONOO}^-$  не відбувається надмірного утворення радикалів глутатіону ( $\text{GS}\bullet$ ). Останній не перетворюється із антиоксиданту в прооксидант, тому знижується інтенсивність процесів ПОЛ до фізіологічної норми [178].

Патогенез дисфункцій клітин крові у разі ЦД 1-го типу є надзвичайно складним і недостатньо вивченим. Мікро- і макроангіопатії, які розвиваються за умов діабету, поряд із прискореним прогресуванням атеросклерозу, супроводжуються порушенням кровообігу, підвищеним тромботичним ризиком і є причинами раптової смерті людей, хворих на діабет. Найважливішими функціональними змінами, які викликають ангіопатії, є підвищення проникності судинної стінки, гемодинамічні розлади, зміни в'язкості крові і дисфункції адгезивної, агрегаційної і міграційної здатності лейкоцитів. Всі ці зміни є узалежненими від морфо-функціонального стану лейкоцитів [93, 185, 210].

За умов різних патологій, і ЦД 1-го типу зокрема, важливе значення у формуванні локомоторних функцій лейкоцитів відіграє внутрішньоклітинний сигнальний ензим – фосфатидилінозитол-3'-кіназа (PI-3'-кіназа) [32]. За умов діабету структурно-функціональні зміни рецепторного апарату лейкоцитів та перехід цих клітин у преактивований стан зумовлені зміною рівня експресії та активності PI-3'-кінази [206]. PI-3'-кіназа, взаємодіючи з інтегриновими рецепторами, бере участь в передачі сигналу як в середину клітини, так і назовні, а також у формуванні фокальних контактів на поверхні мембран лейкоцитів [227]. Серед клітинних білків, які є мішенями для PI-3'-кінази, є низькомолекулярні GTPази, що беруть участь у реалізації такої клітинної відповіді на зовнішнє подразнення як формування стресових фібрил, утворення ламелоподій і філоподій, тобто зміни морфологічного стану клітини і руху [77]. Все це відбувається у результаті реорганізації актинового цитоскелету клітини [160].

Аналізуючи результати проведених досліджень, було встановлено, що рівень полімеризованого актину в лейкоцитах периферичної крові за ЕЦД був достовірно вищим порівняно з контрольною групою тварин, що вказує на їхній преактивований стан і зміну структурно-функціональних властивостей цих клітин у разі діабету. Преактивований стан лейкоцитів характеризується формуванням на поверхні клітини значної кількості коротких псевдоподій. Виявлене нами зростання рівня F-актину в лейкоцитах за умов ЕЦД може бути наслідком стану преактивації лейкоцитів з концентруванням полімеризованого актину у зоні псевдоподій [112]. Літературні дані [31] свідчать, що зростання рівня полімеризації актину хоча б у три рази призводить до дефекту у відповіді клітини під час інтегрин-залежної взаємодії, внаслідок чого знижується адгезія по типу клітина-матрикс [107]. Тому ми припускаємо, що за ЕЦД збільшення рівня полімеризації актинових філаментів може зумовлювати послаблення адгезії лейкоцитів з ендотеліальними клітинами та порушення у процесі проникнення лейкоцитів через судини під час запального процесу. Усі ці зміни під час діабету призводять до зниження кількості лейкоцитів у зоні запалення і, відповідно, зниження ефективного виконання їхніх функцій [33].

У контрольній групі та у тварин з ЕЦД за дії агматину в лейкоцитах спостерігається зниження рівня полімеризованого актину. У разі застосування агматину лейкоцити у контрольній групі щурів характеризувалися округлою формою із локалізацією актинових філаментів у вигляді кортикального кільця. Низькі значення 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 [31].

Встановлений нами коригуючий ефект агматину на функціональний стан лейкоцитів може реалізуватися завдяки впливу на процеси реорганізації елементів актинового цитоскелету. Ми припускаємо, що вплив досліджуваного поліаміну на формування елементів цитоскелету на фоні тривалої гіперглікемії за ЕЦД може бути зумовлений зниженням вмісту глюкози в периферичній крові, що

призводить до пригнічення процесів глікації, які опосередковують перебудови актинового цитоскелету. Відомо, що кінцеві продукти глікації індукують процес полімеризації актину [64].

Наступний етап досліджень проводили з метою вивчення процесів реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів. У разі ЕЦД загальний вміст актину в лейкоцитах периферичної крові знижувався, а введення агматину хворим і здоровим тваринам призводило до зростання вмісту актину, порівняно з ЕЦД та з контролем, відповідно. Корируючий вплив агматину може бути обумовлений потенційною здатністю досліджуваного поліаміну попереджати розвиток метаболічних порушень, індукованих гіперглікемією [164] з огляду на його здатність нормалізувати рівень глюкози за ЦД [81, 116].

Аналізуючи перерозподіл полімеризованого актину між актиновими філаментами цитоскелету та короткими актиновими філаментами було встановлено, що у лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні загального зниження рівня актину зменшується кількість актинових філаментів цитоскелету, проте зростає вміст коротких актинових філаментів. Введення агматину контрольній групі тварин не призводить до перерозподілу актину в цих двох фракціях лізатів лейкоцитів. Тоді як введення цього поліаміну тваринам з ЕЦД зумовлює зростання вмісту актинових філаментів цитоскелету внаслідок реорганізації (деполімеризації) коротких актинових філаментів та залучення G-актину.

У контрольній групі тварин полімеризований актин домінує щодо мономерів актину у співвідношенні 8 : 2, а у тварин з ЕЦД – у співвідношенні 9 : 1. Результати дослідження вказують на те, що хоч вихідний рівень вмісту актину в лейкоцитах крові за умов ЕЦД знижується, проте сам процес полімеризації актину інтенсифікується. Окрім того, слід зазначити, що у разі ЕЦД лейкоцити містять менше актинових мономерів, але характеризуються високим вмістом коротких філаментів порівняно з контролем.

Полімеризація актину може відбуватися двома різними способами. Перший полягає у тому, що мономер актину за участю активаційного Arp2/3 комплексу беруть участь у полімеризації актинових філаментів *de novo*. Другий спосіб

реалізується внаслідок елонгації вже існуючих актинових філаментів у результаті від'єднання кеп-білків і деполімеризації актинових філаментів [185]. Тому, ми можемо припустити, що у разі ЕЦД другий шлях полімеризації актинових філаментів є домінуючим. Окрім того, з коротких філаментів актину розпочинається полімеризація актинових філаментів мембрани в момент активації лейкоцитів і формування псевдоподій на їхній поверхні [113].

Після введення агматину у двох досліджуваних групах полімеризований актин домінує щодо мономерів актину: у контрольній групі – у співвідношенні 9 : 1, а у тварин з ЕЦД – у співвідношенні 8,5 : 1,5. Це вказує на те, що у разі введення агматину тваринам з ЕЦД на фоні високого загального вмісту актину в лейкоцитах крові процес його полімеризації інтенсифікується у фракції філаментів цитоскелету та відбувається деполімеризація коротких актинових філаментів. Зокрема, після ін'єкцій агматину тваринам з ЕЦД вміст коротких актинових філаментів у лейкоцитах знижується майже в 2,5 рази порівняно з аналогічною фракцією за ЕЦД без введення агматину. Тоді як введення агматину контрольній групі тварин не викликає достовірних змін у загальному вмісті актину в лейкоцитах крові, проте призводить до зменшення мономерів актину у результаті інтенсифікації полімеризації у фракції коротких філаментів порівняно з контролем.

Виявлені нами зміни у реорганізації актинового цитоскелету лейкоцитів за умов ЕЦД на фоні тривалої гіперглікемії, вірогідно, обумовлені переходом лейкоцитів у преактивованій стан, який у значній мірі є результатом активації і транслокації регуляторної субодиниці PI-3'-кінази у сайти цитоскелету, які опосередковують інтегрин-залежну фокальну адгезію клітин [32, 206]. PI-3'-кіназа та продукти реакції, що вона каталізує, беруть безпосередню участь у регуляції процесу утворення структур цитоскелету [185]. За наявності в клітині продуктів PI-3'-кіназної реакції (фосфатидилінозитол-3,4-дифосфату і фосфатидилінозитол-1,3,4-трифосфату) від актинових філаментів дисоціюють кеп-білки, внаслідок чого активується полімеризація актину. Фосфатидилінозитолі також можуть виступати інгібіторами фосфорилування актин-регуляторних білків. Ці білки-

регулятори впливають на перерозподіл актинових філаментів – знижують вміст актинових філаментів цитоскелету і пропорційно викликають зростання рівня актину у фракції коротких філаментів і мономерів [127].

У разі діабету під час преактивації лейкоцитів короткі актинові філаменти задіяні в зміні морфології і функції цих клітин. За умов ЕЦД пул коротких актинових філаментів, вміст яких становив 44,3% від клітинного рівня актину, зазнає суттєвого виснаження (до 17,1%) після введення цій групі тварин агматину. Введення цього поліаміну тваринам діабетичної групи викликає полімеризацію актинових філаментів цитоскелету лейкоцитів у результаті використання як праймера коротких філаментів актину. 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 [38, 77].

Отже, результати, отримані різними методичними прийомами (флюоресцентна мікроскопія та імуноблот аналіз), свідчать, що агматин впливає на функціональний стан лейкоцитів через процеси формування елементів цитоскелету лейкоцитів периферичної крові щурів за умов ЕЦД.

Порушення функціонального стану лейкоцитів крові за умов цукрового діабету (ЦД) супроводжується зміною гліканового профілю плазматичних мембран цих клітин крові. Термінальну позицію у структурі олігосахаридних ланцюгів поверхневих глікокон'югатів переважно займають сіалові кислоти. Як компонент рецепторів, сіалові кислоти модулюють широкий спектр фізіологічних і патологічних процесів, зокрема регулюють молекулярно-клітинні взаємодії, трансдукцію клітинних сигналів і транспортування молекул крізь плазматичні мембрани. Модифікація олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнових рецепторів клітин крові призводить до порушення сприймання сигналів із мікрооточення і міжклітинних взаємодій, зокрема дисфункції адгезивної, агрегаційної і міграційної здатності лейкоцитів [27, 185, 210, 229].

Розвиток ЕЦД супроводжується зменшенням вмісту сіаловмісних глікокон'югатів у складі мембран лейкоцитів [27]. Десіалювання зазнають



залишки цукрів, які приєднані як  $\alpha$ 2,3-, так і  $\alpha$ 2,6-глікозидним зв'язком до субтермінальних моносахаридів у структурі гліканів. Кількість N-зв'язаних гліканів на поверхні лейкоцитів у цьому разі не змінюється, а вміст O-гліканів незначно зростає, тому причиною зменшення вмісту сіалових кислот у глікокаліксі лейкоцитів за умов ЕЦД може бути посилене десіалювання мембранних гліканів.

У свою чергу, морфофункціональний стан лейкоцитів узалежнений від комплексної взаємодії між білками мембрани і цитоскелетом, які задіяні в організації і координації сигнальних мереж, у забезпеченні специфічності та інтенсивності внутрішньоклітинного сигналювання [38, 77]. У разі дії стимулювальних чинників лейкоцити активуються, внаслідок чого відбувається швидка полімеризація актинових філаментів із наявних у клітині мономерів G-актину [57]. Дослідження рівня полімеризації актину в лейкоцитах периферичної крові дають змогу детально охарактеризувати їхню преміграційну здатність перед тим, як вони залишать кровообіг, тобто перед діapedезом.

Провівши порівняльний аналіз динаміки полімеризації актину в лейкоцитах у стані спокою та активації, було встановлено, що лейкоцити контрольної групи тварин мають перехідний рівень F-актину, який досяг максимуму на 1-й хвилині стимулювання сіалоспецифічним лектином WGA і потім швидко зменшився до вихідного значення. Це свідчить про те, що лектин WGA зв'язується з комплементарними поверхневими глікокон'югатами, спрацьовує система трансдукції сигналу від мембрани до цитоплазматичних білків і відбувається реорганізація цитоскелету [57]. Ремоделювання актинової складової цитоскелета зумовлює трансформацію клітин від майже сферичної, у стані спокою, в поляризовану асиметричну форму. Така морфологічна поляризація характеризується появою актин-багатих ламелоподій на передньому кінці і хвостових структур на протилежному кінці клітини [79].

На фоні введення агматину здоровим тваринам під полімеризації F-актину спостерігався на 1-у хв стимулювання лектином WGA. Високі значення F-актину на 3-ій хв після дії лектину WGA свідчать про порушення процесу

деполімеризації актину. Ми спостерігаємо нетипово пролонгований час полімеризації. Такі зміни зумовлені порушенням трансдукції сигналу через сіалоглікокон'югати, які у термінальних позиціях містять меншу кількість  $\alpha$ 2,3-зв'язаних залишків сіалових кислот. Найчастіше зниження вмісту сіалових кислот у складі глікокаліксу клітин зумовлене посиленням процесу десіалювання мембранних глікокон'югатів. Варто зазначити, що сіалові кислоти, які приєднані  $\alpha$ 2,3-глікозидним зв'язком до субтермінальних цукрів у структурі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів набагато швидше піддаються гідролітичному відщепленню за участі сіалідаз, ніж  $\alpha$ 2,6-зв'язані залишки цих цукрів. Іншою причиною втрати сіалових кислот з поверхні клітин може бути відщеплення від глікопротеїнів олігосахаридних фрагментів, які є сіалюваними, чи злищування цілих молекул сіаловмісних глікопротеїнів. Однак часто має місце поєднання усіх цих факторів [207].

У лейкоцитах тварин за умов ЦД низька амплітуда полімеризації актину вказує на довготривале несприйняття активаційних сигналів від лектину WGA через сіаловмісні глікокон'югати. У разі діабету підвищений вміст глюкози всередині клітин виявляє інгібувальну дію на ензими, які задіяні у біосинтезі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів [142]. Одним з таких ензимів є сіалілтрансфераза, яка каталізує приєднання сіалової кислоти до субтермінального цукру в структурі глікану [207].

У діабетичній групі на фоні введення агматину спостерігали формування піка полімеризації актину вже на 0,5-у хв стимулювання лектином WGA і дуже стрімкий процес деполімеризації на 1-у хв після дії лектину. Основний внесок у процес трансдукції сигналу зумовлений олігосахаридними ланцюгами глікокон'югатів, які у термінальній позиції містять саме  $\alpha$ 2,3-зв'язані залишки сіалових кислот. Адже у лейкоцитах тварин з ЦД на фоні введення агматину у структурі гліканових епітопів збільшується кількість лише  $\alpha$ 2,3-сіаловмісних глікокон'югатів [80].

Ймовірно, нормалізація вмісту глюкози у тварин з діабетом за умов введення агматину [81] є одним з механізмів, який опосередковує відновлення рівноваги

$\alpha$ 2,3-сіалювання гліканового профілю лейкоцитів, що сприяє підтриманню довготривалої відповіді клітин на активаційні сигнали. Цей своєрідний біологічний ефект узгоджується із зняттям стану преактивованості лейкоцитів після введення агматину [50] і відновленням афінності зв'язування комплементарних лігандів із сіалоглікокон'югатами та трансдукцією лектиніндукованого сигналу, який зумовлює реорганізацію актинового цитоскелету.

Динаміка перерозподілу вмісту фракцій актину у лізатах лейкоцитів у стані спокою (0 хв) і у стані активації вказує на те, що у контрольній групі тварин процес полімеризації актину за умов активації лейкоцитів способом преінкубації з лектином WGA впродовж 0,5 хв спершу інтенсифікується у фракції коротких актинових філаментів, а на 1 хв – у філаментах цитоскелету. Така динаміка полімеризації актину в лейкоцитах контрольної групи тварин відповідає стану активації цих клітин крові у разі дії стимулювальних чинників. Після того, як лектин WGA зв'язується з комплементарними глікокон'югатами на поверхні лейкоцитів, індукується система трансдукції сигналу від мембрани до цитоплазматичних білків, що приводить до активації цитоскелетних структур. Ремоделювання цитоскелету обумовлює трансформацію клітин від майже сферичної, у стані спокою, в поляризовану асиметричну форму. Така морфологічна поляризація лейкоцитів характеризується появою актинбагатих ламелоподій і хвостових структур, збагачених полімеризованим актином [79]. Спершу короткі актинові філаменти утворюються на лідерних (ростучих) кінцях під плазматичною мембраною у зоні філоподій. Згодом на уже наявних філаментах цитоскелету відбувається формування нових філаментів актину під кутом  $70^\circ$ , що і зумовлює утворення розгалуженої сітки полімеризованого актину у зоні ламелоподій [141].

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на 0,5 хв стимулювання лектином WGA процес полімеризації актину інтенсифікується у фракції філаментів цитоскелету. В момент активації лейкоцитів з коротких філаментів актину розпочинається полімеризація довгих ниток F-актину, що приводить до формування ламелоподій

на їхній поверхні. Тому вміст актину коротких філаментів знижується, а вміст актинових мономерів за цих умов не змінювався. 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. Філаменти актину на відстаючому кінці в ділянці ламелоподій зазнають деполімеризації за участі комплексу АДФ/кофілін [117].

Після клітинної активації відбувається швидке короточасне підвищення рівня F-актину, що корелює зі зменшенням концентрації G-актину [218]. Проте за умов ЕЦД в лейкоцитах, активованих лектином WGA, ми навпаки спостерігаємо інтенсифікування процесу деполімеризації коротких актинових філаментів і збільшення концентрації G-актину. Під час активації лейкоцитів короткі актинові філаменти задіяні в зміні морфології і реалізації функціональної здатності цих клітин, а зниження їхнього вмісту у лейкоцитах за умов діабету чітко вказує на порушення усіх цих функцій. Такі зміни, можливо, обумовлені порушеннями на рівні трансмембранного і внутрішньоклітинного сигналювання через сіалоглікокон'югати лейкоцитів, кількість і структурна організація олігосахаридних ланцюгів яких за умов ЕЦД є зміненою [80].

Отримані результати узгоджуються з дослідженнями [206], в яких було встановлено, що за умов ЦД 1-го типу у лейкоцитах крові є розрегульований PI-3'-кіназний сигнальний шлях, що і обумовлює затримку трансдукції WGA-стимулювального сигналу. PI-3'-кіназний сигнальний шлях бере участь у реалізації клітинної відповіді на зовнішнє подразнення, регулюючи активність білків цитоскелету [219] і формування стресових фібрил, ламелоподій і філоподій лейкоцитів [32, 77]. Зміна рівня полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах у разі ЕЦД може вказувати на порушення у системі активації, адгезії, фагоцитозу та прояву цитотоксичності, адже саме актиновий цитоскелет лейкоцита постійно реорганізовується, виступаючи динамічною системою, яка визначає морфофункціональні зміни у клітині [173, 229].

Динаміка перерозподілу вмісту актину у контрольній групі тварин за введення агматину свідчить, що основні зміни в активованих лейкоцитах відбуваються у філаментах цитоскелету, корелюючи зі зміною вмісту мономерів актину. Отримані дані вказують на те, що у контрольній групі тварин введення агматину спричиняє формування відповіді лейкоцитів на активаційні сигнали від лектину WGA на 1 хв впливу та припинення процесу реорганізації актинових філаментів клітин у разі їхньої преінкубації впродовж 3 х. Оскільки рівень F-актинової фракції коротких актинових філаментів на 1 і 3 хв стимульовального ефекту лектину WGA не зазнає достовірних змін порівняно із вихідним станом лейкоцитів (0 хв – без впливу WGA), тому можна припустити, що у контрольній групі тварин агматин зумовлює полімеризацію актинових філаментів *de novo* із мономерів актину за участі активаційного Agr2/3 комплексу [185].

У лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні введення агматину динаміка формування відповіді на стимульовальний вплив лектину WGA характеризувалася інтенсифікуванням полімеризації актину фракції філаментів цитоскелету вже на 0,5 хв впливу лектину, дуже стрімким процесом деполімеризації на 1 хв після дії лектину та повернення показників до рівня у вихідному стані у разі дії лектину впродовж 3 хв. За вказаних умов у лейкоцитах афінність зв'язування сіалоглікокон'югатів із комплементарними лігандами та трансдукція лектиніндукованого сигналу, який обумовлює реорганізацію актинового цитоскелету, майже досягають показників реорганізації актину в активованих лейкоцитах контрольної групи тварин. Ймовірно, нормалізація рівня глюкози у тварин з ЕЦД у відповідь на введення агматину [81, 223] є одним з механізмів, який опосередковує такі функціональні зміни в лейкоцитах за умов ЕЦД.

За умов ЦД у разі використання як індуктора агрегації лектину WGA ступінь і швидкість агрегації лейкоцитів зростали порівняно зі значеннями у контрольній групі. На поверхні лейкоцитів експонуються глікокон'югати з термінальними N-ацетил- $\beta$ ,D-глюкозаміновими залишками [27], які й зумовлюють високі показники WGA-індукованої агрегації. Усі ці зміни у структурі вуглеводної частини гліканів плазматичної мембрани лейкоцитів за умов діабету призводять до порушення

сприйняття молекулярних сигналів із мікрооточення та впливають на характер їхньої взаємодії з іншими циркулюючими клітинами крові й ендотелієм судин [147, 207].

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. У контрольній групі тварин у відповідь на введення агматину на поверхні лейкоцитів збільшується кількість сіаловмісних глікокон'югатів [27], що спричинено синтезом комплексного типу N-гліканів [207]. Тоді як зростання показників WGA-індукованої агрегаційної здатності лейкоцитів у тварин з ЦД на фоні введення агматину зумовлені як збільшенням кількості  $\alpha$ 2,3-зв'язаних залишків сіалових кислот, так і залишків N-ацетил-D-глюкозаміну в складі поверхневих гліканів цих клітин крові [27].

Зміну морфофункціонального стану лейкоцитів за умов ЦД можна пояснити з точки зору порушення фізіологічного балансу між рівнем антиоксидантів і вільнорадикальних сполук [118]. Збереження внутрішньоклітинного рівня АФО у межах норми має життєво важливе значення для деяких цитоскелет-залежних процесів, наприклад, міграції лейкоцитів із кровоносного русла у зону запалення, де вони проявляють їхні основні функції імунокомпетентних клітин [203]. У наших дослідженнях було встановлено, що у лейкоцитах тварин з ЕЦД на фоні загального зниження рівня актину зменшується кількість актинових філаментів цитоскелету, проте зростає вміст коротких актинових філаментів. Однією з причин зміни динамічного процесу полімеризації-деполімеризації актину в лейкоцитах крові за умов ЕЦД є розвиток оксидативно-нітративного стресу. В умовах стресу надмірне окиснення протейнів призводить до руйнування F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів [50, 136, 221]. Надпродукція АФО і АФН збільшує ймовірність окиснення тіолових груп мономерів тубуліну, а також сприяє утворенню дисульфідних зв'язків між  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліном, зменшуючи здатність мікротрубочок до полімеризації та порушуючи структуру актину. У молекулах F-актину мішенями дії окиснювальних молекул є

залишки Cys374 і Met44. Окиснення Cys374 призводить до активного глутатіонілювання, а окиснення Met44 – до деполімеризації активних філаментів [135].

Підсумковий аналіз отриманих результатів, який виявляє причинно-наслідковий вплив досліджуваних показників наведено на рис. 4.1.

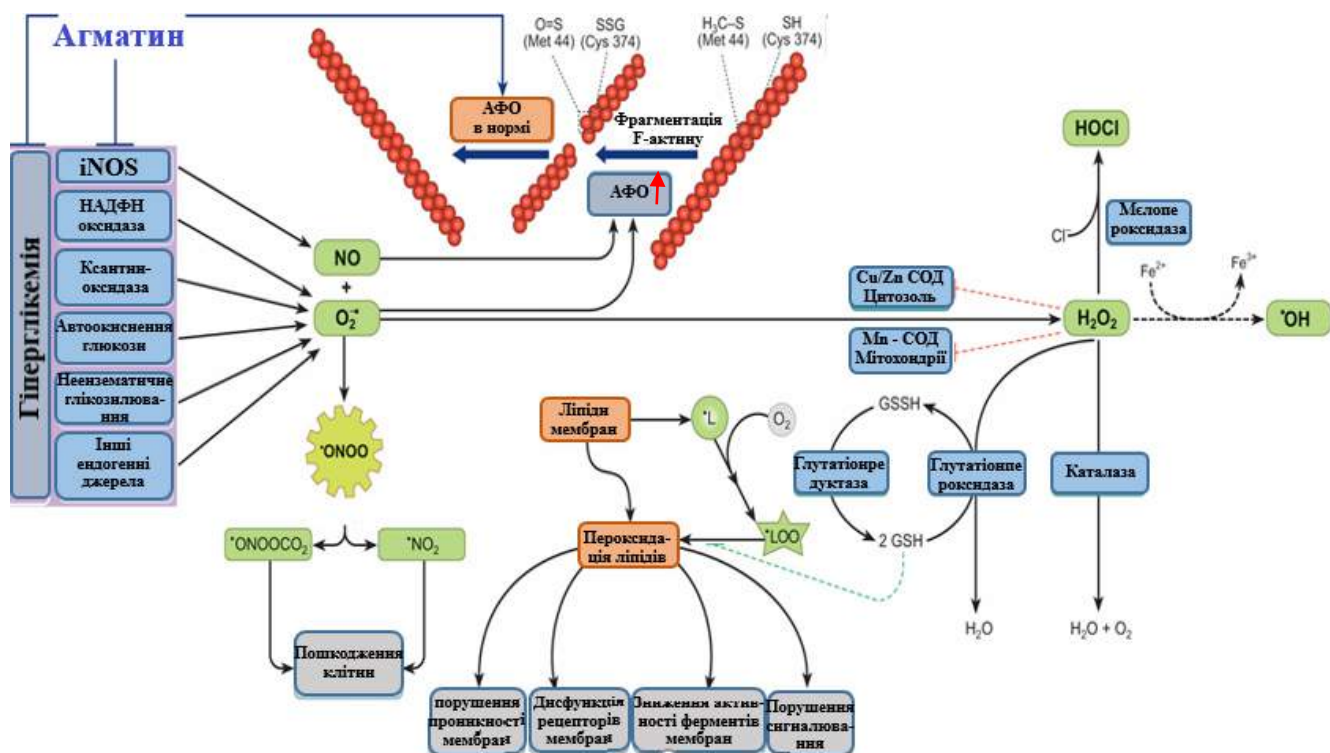


Рис. 4.1. Вплив агматину на окремі показники оксидативно-нітративного стресу та динаміку полімеризації актину у лейкоцитах периферичної крові за умов експериментального цукрового діабету. iNOS – індукцибельна NO-синтаза; NO – оксид нітрогену; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – радикал супероксид-аніона; ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит; ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів; GSH – відновлений глутатіон; GSSG – окиснений глутатіон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – гідроген пероксид; СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатіонпероксидаза; ГР – глутатіонредуктаза.

За умов гіперглікемії надмірне утворення радикала O<sub>2</sub><sup>•-</sup> у результаті аутоокиснення глюкози, неензиматичного глікозилювання білків, інтенсифікації електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, підвищення активності

ксантинооксидази, НАДФН-оксидази та інших метаболічних процесів та надпродукція оксиду нітрогену іNO-синтазою призводять до розвитку оксидативно-нітративного стресу. Супероксид-аніон вступає в реакцію з NO. Утворюється цитотоксичний пероксинітрит та інтенсифікується перекисне окиснення ліпідів. Відбувається зниження рівня відновленого глутатіону і активності ензимів антиоксидантного захисту: супероксиддимутази – каталізує дисмутацію  $O_2^{\bullet-}$  з утворенням  $H_2O_2$  і  $O_2$ ; каталази – каталізує розщеплення  $H_2O_2$  до  $H_2O$  і  $O_2$ ; глутатіонпероксидази – каталізує розщеплення  $H_2O_2$  до  $H_2O$  завдяки окисненню глутатіону; глутатіонредуктази – відновлює окиснений глутатіон [168]. Зростання концентрації АФО і АФН збільшує ймовірність окиснення залишків Cys374 і Met44 у молекулах F-актину. Це призводить до деполімеризації F-актину цитоскелету, порушуючи локомоторні та захисні функції лейкоцитів.

Агматин попереджає розвиток оксидативно-нітритивного стресу у лейкоцитах щурів за умов стрептозотоцин-індукованого діабету. Досліджуваний поліамін 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 сприяє відновленню балансу між процесами полімеризації і деполімеризації актину в лейкоцитах крові (рис. 4.1). Підтвердженням цього ефекту агматину є виявлене нами підвищення вмісту полімеризованого актину у фракції філаментів цитоскелету лейкоцитів тварин з ЕЦД [2, 47, 50, 52]. 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 зростає у лейкоцитах, але зменшувався у плазмі, що пов'язано із здатністю цього поліаміну викликати активацію  $\mu$ -опіоїдних 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 преактивований 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Боднар П. М., Приступюк О. М., Щербак О. В. та ін. *Ендокринологія*; за ред. проф. П. М. Боднара. Київ: Здоров'я. 2002; 512 с.
2. 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; 60(4): 48–55.
3. Бродяк І. Сибірна Н. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету. *Фізіологічний журнал*. 2008; 54 (1): 63–68.
4. Валішкевич Б. В. Участь сигнального шляху TOR в регуляції метаболізму *Saccharomyces cerevisiae* за обмеження вуглеводів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017; 4(6.): 155–160.
5. Воротников А. В. Хемотаксис: движение, направление, управление. *Успехи биологической химии*. 2011; 51: 335–400.
6. Воскобой И. В., Киричук В. Ф., Ребров А. П. Лектининдуцированная агрегация нейтрофильных гранулоцитов у больных нестабильной стенокардией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2002; 6: 23–34.
7. Габбасов З. А., Попов Е. Г., Гаврилов И. Ю. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*. 1989; 10: 15–18.
8. Гжегоцький М. Р., Заячківська О. С. Система крові. Фізіологічні та клінічні основи: *Навчальний посібник*. Львів: Світ. 2001: 1786 с.
9. Гнатів В. В., Демчак Х. С., Бабуленко О. М. Активні форми кисню в патогенезі ангіопатій при цукровому діабеті 2-го типу. *Медична хімія*. 2013; 15(1): 145–149.
10. Гнатуш А. Н., Дрель В. Р., Яланецький А. Я., Мізін В. І., Загоруйко В. А., Гержикова В. Г., Сибірна Н. О. Антиоксидантний ефект природних поліфенольних комплексів винограду у сітківці ока щурів зі цукровим діабетом, індукованим стрептозотоцином. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2011; 5(2): 61–72.

11. Грабовецкая Е. Р., Давыдов В. В. Возрастная динамика активности ферментов метаболизма альдегидов в сердце крыс. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2009; 1: 24–27.
12. Гусев Б. Движение немышечных клеток и реорганизация актиновых микрофиламентов. *Соросовский образовательный журнал*. 2001; 7(7): 9–16.
13. Дрель В. Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу. *Біологічні Студії*. 2010; 4(2): 141–158.
14. Ефимов А. С., Карабун П. М., Эпштейн Е. В. Ожирение и сахарный диабет. *Здоров'я*. 1998; Киев:144 с.
15. Занозина О. В., Боровков Н. Н., Щербатюк Т. Г. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности. *Современные технологии в медицине*. 2010; 3: 104–112.
16. Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г. [та ін.] Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988; 1: 16–18.
17. Кузишин О. В., Ковалишин Н. В., Алмашина Х. В. Біохемія цукрового діабету: 1. Теоретична частина (огляд). *Медична хемія*. 2010; 41: 1–42.
18. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. дело*. 1986; 12: 124–126.
19. Никонова Т. В. Современные аспекты патогенеза сахарного диабета 1 типа. *Сахарный диабет*. 2006; 3: 59–64.
20. Ница Н. А. Роль лейкоцитарной системы в патогенезе диабетической микроангиопатии. *Вестник СПГУ*. 2009; 4(11): 49–53.
21. Пак И. В. Современные представления об этиологии и патогенезе инсулинозависимого сахарного диабета. *Вестник КРСУ*. 2012; 12(2): 130–133.
22. Попова В. В. Уміст діабетасоційованих автоантитіл до острівцевих автоантигенів (IA-2A, GADA, IAA) і рівень різних видів цитокінів у дітей та підлітків на доклінічній і ранній клінічній стадіях розвитку цукрового діабету 1-го типу. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2015; 2(66): 138–146.

23. Сибірна Н., Барська М., Гришук І. Морфофункціональна характеристика імунокомпетентних клітин крові за умов цукрового діабету 1 типу / Н. Сибірна, // *Вісник Львів. УН-Серія біологічна*. 2004; 35: 77–83.
24. Сибірна Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. Львів; *Видавн. центр Львів. нац. ун-ту*. 2006: 60 с.
25. Сибірна Н. О., Бурда В. А., Чайка Я. П. Методи дослідження системи крові. *Львів: Видавн. центр Львів. нац. ун-ту*. 2006: 100 с.
26. Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. *Лабораторное дело*. 1981; 4: 209–211.
27. Ференц І. В., Бродяк І. В., Люта М. Я., Сибірна Н. О. Структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікопротеїнів еритроцитарних мембран при введенні агматину за умов експериментального цукрового діабету. *Цитологія і генетика*. 2013; 47(4): 69–79.
28. Хомерики С. Г., Кубатиев А. А., Шляпников В. Н. Лектининдуцированная агрегация нейтрофильных гранулоцитов до и после облучения крови гелий-неоновым лазером. *Гематология и трансфузиология*. 1993; 38(7): 26–28.
29. Чевари С., Андял Т., Штиренгер Д. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте. *Лаб. дело*. 1991; 10: 9–13.
30. Aboonabi A., Singh I. Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2-ARE as an indicator and modulator of redox. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2015; 72: 30–36.
31. Advani A., Marshall S., Thomas T. Increasing neutrophil F-actin corrects CD11b exposure in Type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004; 34(5): 358–364.
32. Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T. et al. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood*. 2008; 111(3): 1497–1503.

33. Alba-Loureiro T. C., Munhoz C. D., Martins J. O. et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 1037–1044.
34. Alberti K. G., Zimmet P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 1998; 15(7): 539–553.
35. Alberts B., Johnson A., Lewis M., Raff M., Roberts K., Walter P. Leukocyte also known as macrophages functions and percentage breakdown. *Molecular Biology of the Cell (4th ed.)*. New York: Garland Science; 2014.
36. Aldini G., Dalle-Donne I., Facino R., Milzani A., Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev*. 2007; 27(6): 817–868.
37. Alexandrova A., Arnold K., Schaub S., Vasiliev J. M., Meister J. J., Bershad A. D., Verkhovsky A. B. Dynamic Regulation of the Structure and Functions of Integrin Adhesions. *Developmental Cell*. 2013; 24: 447 – 458.
38. Algeciras-Schimnich A., Shen L., Barnhart B. et al. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22: 207–220.
39. American Diabetes Association Diabetes Care. 2014; 37(1).
40. Arjonen A., Kaukonen R. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *J Cell Adh Migr*. 2011; 5(5): 421–430.
41. Asmat U., Abad K., Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016; 24(5): 547–553.
42. Atkins R. C., Zimmet P. Diabetic kidney disease: act now or pay later. *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* 2010; 21(2): 217–221.
43. Auguet M., Viossat I., Marin J. G., Chabrier P. E. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. *J. Pharmacol.* 1995; 69(3): 285–287.
44. Axelsson L., Hellberg C., Melander F., Smith D., Zheng L., Andersson T. Clustering of beta(2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase. *Exp Cell Res*. 2000; 10: 256–261.

45. Bajpai A., Tilley D. G. The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*. 2018; 9:1547–1555.
46. Battaglia V. Agmatine prevents the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent induction of permeability transition in rat brain mitochondria. *Amino Acids*. 2010; 38: 431–437.
47. **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.
48. Bondeva T., Pirola L., Bulgarelli-Leva G., Rubio I., Wetzker R., Wymann M. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science*. 1998; 282: 293–299.
49. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow, with special reference to factors which influence and modify sedimentation properties of hematopoietic cells. *J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 21(1): 1–109.
50. Brodyak I., **Bila I.**, Overchuk M., Sybirna N. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Studia Biologica*. 2014; 8(3-4): 17–30.
51. Brodyak I., **Bila I.**, Sybirna N. Influence of WGA-stimulatory signals on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visnyk of Lviv University. Biological series*. 2016; 73: 35–40.
52. Brodyak I., **Bila I.**, Sybirna N. The dynamics of actin filament polymerization in activated leukocytes under experimental diabetes mellitus against the background of agmatine administration. *Biopolymers and Cell*. 2017; 33(6): 403–414.
53. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6): 1615–1625.
54. Bugyi B., Carlier M. F. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu. Rev. Biophys.* 2010; 39: 449–470.
55. Calabrese V., Cornelius C., Leso V. et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 822(5): 729–736.

56. Cano M. L., Lauffenburger D. A., Zigmond S. H. Kinetic analysis of F-actin depolymerization in polymorphonuclear leukocyte lysates indicates that chemoattractant stimulation increases actin filament number without altering the filament length distribution. *J Cell Biol.* 1991; 115(3): 677–687.

57. Carulli G., Mattii L., Azzara A. et al. Actin polymerization in neutrophils from donors of peripheral blood stem cells: divergent effects of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *American Journal of Hematology.* 2006; 81: 318–323.

58. Cerchiaro G., Scavone C., Texeira S., Sannomiya P. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62(3): 357–362.

59. Chang L., Chiang S. H., Saltiel A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med.* 2010; 10(7-12): 65–71.

60. Chibber R., Kohner E. M., Ben-Mahmud B. M., Chibber S. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr. Diabetes Rev.* 2007; 3(1): 3–14.

61. Cho S., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr Med Chem.* 2007; 14(15): 1653–1671.

62. Cicchetti G., Allen P., Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(3): 220–228.

63. Cinamon G., Shinder V., Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol.* – 2001. – Vol. 2, № 6. – P. 515 – 522.

64. Collison K. S., Parhar R. S., Meyer B. F., Kwaasi A. A., Hammami M. M., Schmidt A. M., Al-Mohanna F. A. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71(3): 433–444.

65. Condello S., Currò M., Ferlazzo N., Caccamo D., Satriano J., Ientile R. Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-kappaB activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y. *J. Neurochem.* 2011; 116: 67–75.



66. Dale D., Boxer L., Liles W. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008; 112(4): 935–945.
67. Denicola A., Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology*. 2005; 208(2): 273–288.
68. Devendra D., Eisenbarth G. S. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(2): 624–636.
69. Donnelly S., Bravo-Cordero J., Hodgson L. Rho GTPase isoforms in cell motility. *Cell Adh Migr*. 2014; 8(6): 526–534.
70. Drel V., Sybirna N. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Cell. Biol. Int*. 2010; 34: 1147–1153.
71. Eisenbarth G. S. Insulin autoimmunity: immunogenetics, immunopathogenesis of type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 1005: 109–118.
72. Eisenbarth G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N. Engl. J. Med*. 1986; 314(21): 1360–1368.
73. Eknayan G., Nagy J. A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Adv Chronic Kidney*. 2005; 12(2): 223–229.
74. Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R., Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000; 43(12): 1528–1533.
75. Engelhardt B., Laschinger M., Vajkoczy P. Investigation of Molecular Mechanisms Involved in T Lymphocyte Recruitment across the Blood. *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease*. 2004; 19–31.
76. Evans J. L., Goldfine I. D., Maddux B. A., Grodsky G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002; 23(5): 599–622.
77. Fais S., Malorni W. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J of Leukocyte Biology*. 2003; 73: 556–563.

78. Feng, Y., Halaris A. E., Piletz J. E. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1997; 691(2): 277–286.
79. Fenteany G., Glogauer M. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol.* 2003; 11: 15–24.
80. Ferents I., Brodyak I., Lyuta M., Klymyshyn N., Burda V., Sybirna N. Sialylation status of leukocyte cell-surface glycoconjugates in streptozotocin-induced diabetic rats and after treatment with agmatine. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences.* 2013; 26(4): 390–402.
81. Ferents I. V., Brodyak I. V., Lyuta M. Y., Burda V. A., Gavrylyshyn G. S., Sybirna N. O. Effect of agmatine on the blood system parameters of rats under the condition of experimental diabetes mellitus. *Studia Biologica.* 2012; 6(3): 65–72.
82. Ferents I. V., Brodyak I. V., Lyuta M. Y., Burda V. A., Sybirna N. O. Suppressing effect of agmatine on genetically programmed death of leukocytes in a diabetes model. *Cytology and Genetics.* 2016; 50(4): 241–250.
83. Ferreiro J. L., Gómez-Hospital J. A., Angiolillo D. J. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2010; 3: 251–259.
84. Frank R. N. Diabetic retinopathy. *Engl Med.* 2004; 350: 48–58.
85. Galbraith C. G., Yamada K. M., Galbraith J. A. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science.* 2007; 315(5814): 992–995.
86. Galea E., Regunathan S., Eliopoulos V. et al. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J.* 1996; 316: 247–249.
87. Gamkrelidze N., Sanikidze T., Pavliashvili N., Petriashvili T., Topuridze M. Changes of lipoperoxidation and antioxidative enzymes during crush-syndrome modelling. *Georgian med news.* 2016; 251: 84–88.
88. Garcia-Mata R., Boulter E., Burridge K. The 'invisible hand': regulation of Rho GTPases by RhoHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(8): 493–504.

89. García-Ponce A., Citalán-Madrid A., Velázquez-Avila M., Vargas-Robles H., Schnoor M. The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity. *Thromb Haemost.* 2015; 113(1): 20–36.
90. Gehrman W., Elsner M., Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes Obes Metab.* 2010; 12(2): 149–158.
91. Gerus I. V., Bevzo V. V., Ferenchuk O. Y. The Effect of melatonin on lipid peroxide oxidation, oxidative modification of proteins and mitochondria swelling in the skeletal muscle tissue of rats under alloxan diabetes. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(3): 62 – 67.
92. Ghesquiere B., Wong B. W., Kuchnio A., Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature.* 2014; 511: 167–176.
93. Giammarioli A. M., Garofalo A., Sorice M. et al. GD3 glycosphingolipid contributes to Fas-mediated apoptosis via association with ezrin cytoskeletal protein. *FEBS Lett.* 2001; 506: 45–50.
94. Gilad G. M., Salame K., Rabey J. M., Gilad V. H. Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life Sci.* 1996. 58(2): 41–46.
95. Gkogkolou P., Böhm M. Advanced glycation end products. *Dermato-Endocrinology.* 2012; 4(3): 259–270.
96. Gloster T. M., Vocadlo D. J. Developing inhibitors of glycan processing enzymes as tools for enabling glycobiology. *Nature Chem Biol.* 2012; 8: 683–694.
97. Goldberg D. M., Spooner R. J., Bergmeyer H. U. Glutathione reductase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. *Weinheim: Verlag Chemie.* 1983; 3: 258–265.
98. Goley E. D., Welch M. D. The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 713–726.
99. Gomes E. C., Silva A. N., Oliveira M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2012; 2012: 12–20.
100. Góth L., Bigler N. Catalase deficiency may complicate urate oxidase (rasburicase) therapy. *Free Radic Res.* 2007; 41(9): 953–955.

101. Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 287(2): 262–268.
102. Goyal S. N., Reddy N. M., Patil K. R., Nakhate K. T., Ojha S., Patil C. R. and Agrawal Y. O. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem. Biol. Interact.* 2016; 244: 49–63.
103. Gradinaru D., Borsa C., Ionescu C., Margina D. Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with type 2 diabetes. *Journal of Proteomics.* 2013; 13: 181–184.
104. Graves, D. T., Kayal R. A. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front. Biosci.* 2008; 13: 1227–1239.
105. Greenacre S. A., Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences on protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.* 2001; 34(6): 541–581.
106. Guerra E.J. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An.Med.Interna.* 2001; 6: 326–335.
107. Guo P., Zhang Y., Zhao J. H. Regulation on the expression and N-glycosylation of integrins by N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 310(2): 619–626.
108. Guzyk M. M., Dyakun K. O., Yanitska L. V., Kuchmerovska T. M. Influence of Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on some parameters of oxidative stress in blood leukocytes of rats with experimental diabetes. *Ukr. biochem. J.* 2013; 85(1): 62–70.
109. Haenisch B., Kgelgen I., Bonisch H., Gothert M., Sauerbruch T., Schepke M., Marklein G., Hofling K., Schroder D., Molderings G. Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008; 295(5): 1104–1110.
110. Hamm H. E. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 1998; 273(2): 669–672.

111. Handin R. I., Lux S. E., Stossel T. P. Blood: Principles and Practice of Hematology (2nd ed.). *Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins*. 2003; 471–481.
112. Hannigan M., Zhan L., C.-K. Huang. Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal reorganization in murine neutrophils in vitro. *J. of Leukocyte Biology*. 2001; 69: 497–504.
113. Hannigan M., Zhan L., Li Z., Ai Y., Wu D., Huang C. K. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(6): 3603–3608.
114. He K., Li X., Chen X. et al. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 137(3): 1135–1142.
115. Hong L. F., Li X. L., Luo S. H., Guo Y. L., Liu J., Zhu C. G. Relation of leukocytes and its subsets counts with the severity of stable coronary artery disease in patients with diabetic mellitus. *PLoS One*. 2014; 9(3): 906–913.
116. Hwang S. L., Liu M., Tzeng T. F., Cheng J. T. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2005; 48(4): 767–775.
117. Ichetovkin I., Grant W., Condeelis J. Cofilin Produces Newly Polymerized Actin Filaments that Are Preferred for Dendritic Nucleation by the Arp2/3 Complex. *Current Biology*. 2002; 12(1): 79–84.
118. Ighodaro O. M., Akinloye O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2017; 1–8.
119. Jay S. Skyler M., Macp D., Pugliese A. Immunotherapy Trials for Type 1 Diabetes: The Contribution of George Eisenbarth. *Diabetes technology and therapeutics*. 2013; 15(2): 13–20.
120. Jou S. B., Liu I. M., Cheng J. T. Activation of imidazoline receptor by agmatine to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett*. 2004; 358(2): 111–114.

121. Kalapos M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact.* 2008; 171(3): 251–271.
122. Kanga Y., Liu J., Song B., Feng X., Ou L., Wei L., Lai X., Shao L. Potential links between cytoskeletal disturbances and electroneurophysiological dysfunctions Induced in the central nervous system by inorganic nanoparticles. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 40: 1487–1505.
123. Kathleen M., Gillespie K. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ.* 2006; 175(2): 165–170.
124. Kawasaki E., Abiru N., Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2004; 66: 27–32.
125. Kenneth M., Daniela Morhan S., Zhong Z. Oxidative Stress Biology and Cell Injury During Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Current neurovascular research.* 2007; 4(1): 63–71.
126. Kim E., Choi E. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *J Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802(4): 396–405.
127. Kleveta G., Borzecka K., Zdioruk M. et al. LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. *J. of Cellular Biochemistry.* 2012; 113: 80–92.
128. Kolm-Litty V., Sauer U., Nerlich A. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin Invest.* 1998; 101: 160–169.
129. Koya D. Jirousek M. R., Lin. Y. W. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. Clin Invest.* 1997: 115–126.
130. Krishna C. S., Srikanta S. Type 1 diabetes pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015; 19(1): 58–63.
131. Kulwant S., Miyagi M., Proc D. J. Proteomic method identifies proteins nitrated *in vivo* during inflammatory challenge. *Natl Acad Sci.* 2001; 98(21): 12056–12061.

132. Kwiatkowska K., Sobota A. Engagement of spectrin and actin capping of FcγRII revealed by studies on permeabilized U937 cells. *Biochem. and biophys. research communications*. 1999; 259(2): 287–293.
133. Kwiatkowska K., Frey J., Sobota A. Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: The role of membrane rafts. *J. Cell Sci*. 2003; 116: 537–550.
134. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–684.
135. Landino L. M., Koumas M. T., Mason C. E., Alston J. A. Modification of tubulin cysteines by nitric oxide and nitroxyl donors alters tubulin polymerization activity. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20: 1693–1700.
136. Lee C. F., Liu C. Y., Hsieh R. H., Wei Y. H., Ann N. Y. Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. *Acad Sci*. 2005; 1042: 246–254.
137. Lee C.-L., Chiu P. C. , Pang P.-C., Chu I. K., Lee K.-F., Koistinen R. et al. Glycosylation Failure Extends to Glycoproteins in Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 2011; 60: 909–917.
138. Li R., Zhang P., Barker L. E., Chowdhury F. M., Zhang X. Cost-effectiveness of interventions to prevent and control diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes Care*. 2010; 33: 1872–1894.
139. Li, W., Huang E., Gao S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 57(1): 29–36.
140. Limon-Pacheco J., Gonsebatt M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative. *Mutation Research*. 2009; 674: 137–147.
141. Lin B. H., Tsai M. H., Lii C. K., Wang T. S. IP3 and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells. *Environ Toxicol*. 2016; 31(11): 1293–1306.

142. Liu K., Liu H. Y., Ye W., Jiang J. H., Xu X. The initial investigation of the expression of glycosyltransferases in the retina of streptomycin diabetic rats. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2010; 46(7): 580–584.
143. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8): 118–124.
144. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193(1): 265–275.
145. Lozinska L. M., Semchyshyn H. M. Biological aspects of nonenzymatic glycosylation. *Ukr. Biochem. J*. 2012; 84(5): 16–33.
146. Luevano-Contreras C., Chapman-Novakofski K. Advanced Glycation End Products and Aging Nutrients. *Dietary*. 2010; 2: 1247–1265.
147. Ma J., Hart G. W. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics*. 2013; 10(4): 365–380.
148. Mantovani G., Treppiedi D., Giardino E., Catalano R., Mangili F., P. Vercesi, M. Arosio, A. Spada, E. Peverelli Cytoskeleton actin-binding proteins in clinical behavior of pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2019; 26(2): 95–108.
149. Maritim A. C., Sanders R. A., Watkins J. B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J. Biochem. Molecular. Toxicology*. 2003; 17(1): 24–38.
150. Matschke V., Theiss C., Matschke J. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. *Neural Regen Res*. 2019; 14(2): 238–241.
151. Mitoma J. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat. Immunol*. 2007; 8: 409–418.
152. Mun C. H., Lee W. T., Park K. A., Lee J. E. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol*. 2010; 43(3): 230–240.
153. Muscogiuri G., Salmon A. B., Aguayo-Mazzucato C., Li M., Balas B., Guardado-Mendoza R., Giaccari A., Reddick R. L., Reyna S. M., Weir G., RDefronzo. A., Van Remmen H., Musi N. Genetic Disruption of SOD1 Gene Causes Glucose Intolerance and Impairs  $\beta$ -Cell Function. *Diabetes*. 2013; 62(12): 4201–4207.



154. Myers M. A. Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. *Diabetes*. 1995; 44(11): 1290–1295.
155. Nakayama M., Suzuki K., Toda M., Okubo S., Hara Y., Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res*. 1993; 21(4): 289–299.
156. Nalysnyc L., M. Hernandez-Medina, G. Krishnarajah Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes. Metab*. 2010; 12(4): 288–298.
157. Neer E. J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995; 80(2): 249–257.
158. Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2003; 35: 1619–1638.
159. Ninković J., Roy S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids*. 2013; 45(1): 9–24.
160. Nuno H. T. Yamazaki, S. Kanegasaki Neutrophil cytoskeletal disease. *Int. J. Hematol*. 2001; 74(2): 119–124.
161. O’Brein P. J., Siraki A. G., Shangari N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Clin. Rev. Toxicol*. 2005; 5: 669–662.
162. Odorizzi G. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem*. 2000; 25(5): 229–235.
163. Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O., Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *Biol Chem*. 2015; 269(5): 3568–3573.
164. Özyazgan S., Bicakci B., Ozaydin A. et al. The effect of agmatine on the vascular reactivity in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2003; 48(2); 133–138.

165. Pacher P., Szabo C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6: 136–141.
166. Padgett L. E., Broniowska K. A., Hansen P. A., Corbett J. A., Tse H. M. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1281: 16–35.
167. Paneni F., Beckman J. A., Creager M. A., Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European Heart Journal.* 2013; 34(31): 2436–2443.
168. Papayannopoulos V., Metzler K., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *JCB.* 2010; 191(3): 677–691.
169. Park C. H., Noh J. S., Tanaka T., Uebaba K., Cho E. J., Yokozawa T. The effects of corni fructus extract and its fractions against  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities in vitro and sucrose tolerance in normal rats. *Am J Chin Med.* 2011; 39(2): 367–380.
170. Patel H., Chen J., Das K. C., Kavdia M. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovascular Dialectology.* 2013; 12(1): 142–146.
171. Poeta V., Massara M., Capucetti A., Bonecchi R. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019; 10: 1–10.
172. Pollard T. D., Borisy G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003; 112: 453–465.
173. Pollard T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct.* 2007; 36: 451–477.
174. Putta V. R., Chintakuntla N., Mallepally R. R., Avudoddi S. K., Nancherla D., SSurya. S., Sirasani S. Synthesis and Evaluation of In Vitro DNA Protein Binding Affinity, Antimicrobial, Antioxidant and Antitumor Activity of Mononuclear Ru(II) Mixed Polypyridyl Complexes. *J Fluoresc.* 2016; 26(1): 225–240.

175. Raasch W., Schfer U., Qadri F., Dominiak P. Agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites, does not antagonize the clonidine-mediated blood pressure reaction. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135(3): 663–672.

176. Raasch W., Regunathan S., Li G., Reis D. J. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci.* 1995; 56(26): 2319–2330.

177. Raasch W., Schafer U., Chun J., Dominiak P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Pharmacol.* 2001; 133(6): 755–780.

178. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004; 101(12): 4003–4008.

179. Rahigude A., Bhutada P., Kaulaskar S., Aswar M., Otari K. Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience.* 2012.; 226: 62–72.

180. Rellier N., Ruggiero-Lopez D., Lecomte M., Lagarde M., Wiernsperger N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci.* 1999; 64(17): 1571–1583.

181. Remedios C. G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry D. A., Nosworthy N. Actin and actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *J. Physiological Reviews.* 2003; 83: 433–473.

182. Rizvi S. I., Chakravarty S. Day and night GSH and MDA levels in healthy adults and effects of different doses of melatonin on these parameters. *International Journal of Cell Biology.* 2011; 11: 404–409.

183. Rullo J., Becker H., Hyduk S. J., Wong J. C., Digby G., Arora P. D., Cano A. P., Hartwig J., McCulloch C. A., Cybulsky M. I. Actin polymerization stabilizes  $\alpha\beta 1$  integrin anchors that mediate monocyte adhesion. *J Cell Biol.* 2012; 197(1): 115–129.

184. Sahng Kim Y., Mary A., Johnson D., McLeod S., Alexander T., Hansen B. C., Luty G. A. Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas. *Diabetes.* 2005; 54(5): 1534–1542.

185. Samstag Y., Eibert S. M., Klemke M., Wabnitz G. H. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 30–48.

186. Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids*. 2004; 26(4): 321–329.
187. Satriano J., Isome M., Casero R. A., Thomson S. C., Blantz R. C. Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281(1): 329–334.
188. Schnoor M. Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *J Immunol*. 2015; 194(8): 3535–3541.
189. Scott R. W., Hooper S., Crighton D., Li A., König I., Munro J., Trivier E., G. Wickman, Morin P., Croft D., Dawson J., Machesky L., Anderson K. I., Sahai E. A., Olson M. F. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *The journal of cell biology*. 2010; 191(1): 169–185.
190. Seidler N. W. Carbonyl-induced enzyme inhibition: mechanisms and new perspectives. *Curr. Enz. Inhib.* 2005; 1(1): 21–27.
191. Servant G., Weiner O. D., Herzmark P., Balla T., Sedat J. W., Bourne H. R. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. 2000; 287(5455): 1037–1040.
192. Shima Y., Maeda T., Aizawa S., Tsuboi I., Kobayashi D., Kato R., Tamai I. L-arginine import via cationic amino acid transporter CAT1 is essential for both differentiation and proliferation of erythrocytes. *Blood*. 2006; 107(4): 1352–1356.
193. Shimonaka M., Katagiri K., Nakayama T., Fujita N., Tsuruo T., Yoshie O., Kinashi T. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol*. 2003; 161(2): 417–427.
194. Shukla K., Dikshit P., Tyagi M. K., Shukla R., Gambhir J. K. Ameliorative effect of *Withania coagulans* on dyslipidemia and oxidative stress in nicotinamide streptozotocin induced diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50(10): 3595–3599.
195. Siemeniuk E., Kolodziejczyk L., Skrzydlewska E. Oxidative modifications of rat liver cell components during *Fasciola hepatica* infection. *Toxicol. Mechanism Meth*. 2008; 18(6): 519–524.

196. Sifuentes-Franco S., Padilla-Tejeda D. E., Carrillo-Ibarra S., Miranda-Díaz A. G. Oxidative Stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy. *Int J Endocrinol.* 2018; 187–200.
197. Sigala I., Zacharatos P., Toumpanakis D., Michailidou T., Noussia O., Theocharis S., Roussos C., Papapetropoulos A., Vassilakopoulos T. MAPKs and NF- $\kappa$ B differentially regulate cytokine expression in the diaphragm in response to resistive breathing: the role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300(5): 1152–1162.
198. Singh V. P., Bali A., Singh N., Jaggi A. S. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014; 18(1): 1–14.
199. Sit S. T., Manser E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 2011; 124: 679–683.
200. Snapp K. R., Heitzig E., Kansas G. S. Attachment of the PSGL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leukocyte rolling on P-selectin. *Blood.* 2002; 99(12): 4494–4502.
201. Soskić S. S., Dobutović B. D., Sudar E. M., Obradović M. M., Nikolić D. M., Djordjevic J. D., Radak D. J., Mikhailidis D. P., Isenović E. R. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. *Open Cardiovasc Med J.* 2011; 5: 153–163.
202. Spitaler, M. M., Graier W. F. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2002: 476–494.
203. Stanley A., Thompson K., Hynes A. et al. NADPH Oxidase Complex-Derived Reactive Oxygen Species, the Actin Cytoskeleton, and Rho GTPases in Cell Migration. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2014; 20(13): 2026–2042.
204. Stoika R. S., Lutsik M. D., Barska M. L. et al. In vitro studies of activation of phagocytic cells by bioactive peptides. *J. of Physiol. and Pharm.* 2002; 53(4): 675–688.
205. Suire S., Hawkins P., Stephens L. Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Curr Biol.* 2002; 12(13): 1068–1075.
206. Sybirna N. O., Zdioryk M., Brodyak I. V. et al. Activation of the phosphatidylinositol-3'-kinase pathway of lectin-induced signal by sialocontaining

leukocytes membrane glycoprotein in healthy donors and under type 1 diabetes mellitus. *Ukr. Biochem. J.* 2011; 83(5): 22–31.

207. Sybirna N. O., Shevtsova A. I., Ushakova G. O., Brodyak I. V., Pismenetzka I. Y. Fundamentals of glycobiology. *Monograph.* Lviv: Ivan Franko National University of Lviv. 2015: 490.

208. Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007; 6(8): 662–680.

209. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in  $\beta$  cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 2001; 50(6): 536–546.

210. Tipu H. N., Ahmed T. A., Bashir M. M. Human Leukocyte Antigen Class II Susceptibility Conferring Alleles Among Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus Patients. *J. of the College of Physicians and Surgeons Pakistan.* 2011; 21(1): 26–29.

211. Tringer P. Determination of blood glucose using 4-aminophenazone as oxygen acceptor. *Ann. Clin. Patol.* 1969; 22(2): 246–248.

212. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res.* 2010; 59(2): 147–156.

213. Uruska A., Michalska A., Ostrowska J., Skonieczna P., Lipski D., Uruski P., Pakuła M., Tykarski A., Zozulinska-Ziolkiewicz D. Is cathelicidin a novel marker of diabetic microangiopathy in patients with type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 2017; 50(18): 1110–1114.

214. Van Belle T. L., Coppieters K. T., von Herrath M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 2011; 91(1): 79–118.

215. Varashree B. S., Bhat P. G. Correlation of lipid peroxidation with glycated haemoglobin levels in diabetes mellitus. *Online Journal of Health and Allied Sciences.* 2011; 10(2): 1–4.

216. Vicente-Manzanares M., Sánchez-Madrid F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(2): 110–122.

217. Vrhovac I., Breljak D., Sabolić I. Glucose transporters in the mammalian blood cells *periodicum biologorum.* *Periodicum biologorum.* 2014; 116(2): 131–138.

218. Watts R. G., Crispens M. A., Howard T. H. A quantitative study of the role of F-actin in producing neutrophil shape. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1991; 19(3). – P. 159 – 168.
219. Welch M. D. The world according to arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol*. 1999; 9: 423–427.
220. Wieland T., Miura T., A. Seeliger Analogs of phalloidin: D- Abu2- Lys7- phalloin, an F- actin binding analog, its rhodamine conjugate (RLP) a novel fluorescent F- actin- probe, and D- Ala2- Leu7- phalloin, an inert peptide. *International journal of peptide and protein research*. 2009; 21(1): 3–10.
221. Wilson C., Nunez M. T., Gonzalez-Billault C. Contribution of NADPH oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *J Cell Sci*. 2015; 128: 2989–2995.
222. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A. T., Zingraff J., Jungers P., Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996; 49(5): 1304–1313.
223. Wu G., Bazer F. W., Davis T. A., Kim S. W., Li P., Marc Rhoads J., Carey M., Smith S. B., Spencer T. E., Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009; 37: 153–168.
224. Yamabe N., Kang S., Matsuo Y., Tanaka T., Yokozawa T. Identification of antidiabetic effect of iridoid glycosides and low molecular weight polyphenol fractions of Corni Fructus, a constituent of Hachimi-jio-gan, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull*. 2007; 30(7): 1289–1296.
225. Yan H., Harding J. J. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem. J*. 1997; 328: 599–605.
226. Younessi P., Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress. *Iran J Med Sci*. 2011; 36(3): 154–166.

227. Yu W., Cassara J., Weller P. F. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood*. 2000; 95(3): 1078–1085.

228. Zarbock A., Kempf T., Wollert K. et al. Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing inflammation. *J. Mol. Med.* 2012; 90(4): 353–359.

229. Zarbock A., Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol.* 2008; 172(1): 1–7.

230. Zhang H., Cicchetti G., Onda H., Koon H. B., Asrican K., Bajraszewski N., Vazquez F., Carpenter C. L., Kwiatkowski D. J. Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest.* 2003; 112(8): 1223–1233.



## ДОДАТКИ

### Додаток А

#### Список публікацій здобувача за темою дисертації

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

2. Brodyak I. V. The dynamics of actin filament polymerization in activated leukocytes under experimental diabetes mellitus against the background of agmatine administration rats / I. V. Brodyak, **I. I. Bila**, N. O. Sybirna. *Biopolymers and Cell*. 2017. Vol. 33, № 6. P. 403–414. (Scopus, Scientific Journal Rankings = 0.417). (Здобувач виконала клітинно-біологічні дослідження спільно із співавторами та взяла участь в узагальненні та аналізі отриманих результатів).

3. Бродяк І. В. Вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету / І. В. Бродяк, **І. І. Біла**, Н. О. Сибірна. *Фізіологічний журнал*. 2017. Т. 63, № 4. С. 48–55. (IF – 0.06, Scientific Journal Rankings – 0.130). (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, здійснила основні експерименти, узагальнила результати та брала участь у підготовці публікації).

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

5. Brodyak I. V. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats / I. V. Brodyak, **I. I. Bila**, M. Overchuk, N. O. Sybirna. *Studia Biologica*. 2014. Т. 8, № 3–4. С. 17–30. (Здобувач виконала клітинно-біологічні дослідження *in vitro* та спільно із співавторами брала участь у аналізі отриманих даних).

6. Dzydzan O. Biochemical effects of agmatine on peripheral blood erythrocytes and leukocytes in diabetes mellitus / O. Dzydzan, **I. Bila**, I. Ferents, I. Brodyak, M. Lyuta, V. Burda, N. Sybirna // X International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, 8–11 April, 2014 : Abstracts. Lviv, 2014. P. 53.

7. Сибірна Н. О. Вплив агматину на структурно-функціональний стан лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у щурів / Н. О. Сибірна, I. В. Бродяк, I. В. Ференц, **I. I. Біла** // XI Український біохімічний конгрес, 6–10 жовтня, 2014 р.: тези. – Український біохімічний журнал. 2014. Т. 86, № 5 (спеціальний випуск, додаток 2, 2014). – С. 29–30.

8. Bila I. Agmatine effect on actin polymerization in leukocytes of diabetic rats / **I. Bila**, M. Overchuk, I. Brodyak, N. Sybirna // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17–20 вересня 2014 р.: збірник тез. Ужгород, 2014. С. 14.

9. Overchuk M. Agmatine administration normalizes actin polymerization levels and inhibits leukocyte apoptosis in rats with diabetes mellitus / M. Overchuk, I. Brodyak, I. Ferents, **I. Bila**, N. Klymyshyn, N. Sybirna // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 20–23 квітня 2015 р. : збірник тез. Львів, 2015. С. 84–85.

10. Біла І. Динаміка полімеризації актинових філаментів лейкоцитів за умов експериментального цукрового діабету у разі стимулювання лектином WGA / **I. Біла**, I. Бродяк, Н. Сибірна // Актуальні проблеми сучасної біохімії, присвяченій до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова, 16–18 листопада 2016 р. : Вісник Львівського університету. Серія біологічна, випуск 73. Львів, 2016. С. 114.

**11.** Біла І. Вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актинового цитоскелету в лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину / **І. Біла**, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 25–27 квітня 2017 р. : збірник тез. Львів, 2017. С. 224–225.

**12.** Brodyak I. Effect of agmatine on actin reorganization in WGA-stimulated leukocytes under experimental diabetes mellitus / I. Brodyak, M. Sabadashka, **I. Bila**, N. Sybirna // 7<sup>th</sup> International Weigl Conference, September 26–29, 2017: Abstracts. Lviv, 2017. P. 148.

**13.** Біла І. Динаміка зміни вмісту мономерного актину в активованих лейкоцитах тварин з експериментальним цукровим діабетом на фоні введення агматину / **І. Біла**, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 10–12 квітня 2018 р. : збірник тез. Львів. 2018. С. 88–89.

**14.** Біла. І. Вплив агматину на вміст окремих метаболітів оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах крові за умов стрептозоточин-індукованого цукрового діабету / **І. Біла**, І. Бродяк, Н. Сибірна // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 9–11 квітня 2019 р.: збірник тез. Львів. 2019. С. 58.

**15.** Bila I. State of the antioxidant system of blood leukocytes under conditions of experimental diabetes mellitus on the background of agmatine injection / **I. Bila**, I. Brodiak, N. Sybirna // 4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, May 20–24, 2019: Abstracts. Kyiv, 2019. P. 366.