

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КАРМАШ ОЛЕКСАНДР ІГОРОВИЧ

УДК [577.124.013:535-2]:[616.379-008.64:599.323.4]

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНІ ЕФЕКТИ ФОТОБІОМОДУЛЯЦІЙНОЇ ТЕРАПІЇ ЗА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ О.І. Кармаш

Науковий керівник: Сибірна Наталія Олександрівна, доктор біологічних наук,
професор

Львів – 2021

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	5
SUMMARY	9
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ	13
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ОСНОВНА ЧАСТИНА	18
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Біологічні механізми розвитку цукрового діабету	25
1.1.1. Розвиток оксидативного стресу у клітинах крові	33
1.1.2. Молекулярні механізми транспорту глюкози в клітини та його особливості за ЦД	38
1.2. Біологічні ефекти фотобіомодуляційної терапії	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	50
2.1. Умови проведення досліджень	50
2.2. Характеристика об'єкту досліджень	50
2.3. Вимірювання концентрації глюкози	51
2.4. Глюкозонантажувальний тест	52
2.5. Виділення лейкоцитів	52
2.6. Визначення кількості еритроцитів	52
2.7. Визначення кількості лейкоцитів	53
2.8. Морфологічні дослідження формених елементів крові	53
2.8.1. Приготування мазків крові	53
2.8.2. Визначення кількості ретикулоцитів	54
2.9. Визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика	54

2.10. Визначення вмісту гемоглобіну	55
2.11. Визначення вмісту протопорфірину	56
2.12. Визначення спорідненості гемоглобіну до кисню	56
2.13. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну	57
2.14. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів	58
2.15. Визначення концентрації білка	58
2.16. Визначення активності каталази	58
2.17. Визначення активності супероксиддисмутази (СОД)	59
2.18. Визначення активності мієлопероксидази	60
2.19. Визначення вмісту окисно модифікованих білків (ОМБ)	60
2.20. Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації білків	61
2.21. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікозилювання білків	61
2.22. Імунодетекція RAGE	61
2.23. Визначення вмісту нітрит-аніонів (NO_2^-)	63
2.24. Визначення активності сумарної та індукцибельної NO-синтази (NOS)	63
2.25. Визначення активності поглинання глюкози	64
2.26. Визначення вмісту АТФ	64
2.27. Визначення вмісту АФО	65
2.28. Дослідження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів	65
2.29. Визначення бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів по реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ–тест)	67
2.30. Статистична обробка результатів	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	69
3.1. Вплив ФБМТ на окремі гематологічні показники	69
3.2. Вплив ФБМТ на розвиток оксидативно-нітративного стресу	79

3.3. Вплив ФБМТ на глікемічний профіль організму та енергозабезпечення лейкоцитів щурів за ЕЦД	95
3.4. Вплив ФБМТ на функціональний стан лейкоцитів крові щурів за умов ЕЦД	103
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	110
ВИСНОВКИ	117
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	119
ДОДАТОК 1	134

АНОТАЦІЯ

Кармаш О.І. Біохімічні ефекти фотобіомодуляційної терапії за експериментального цукрового діабету. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Міністерство освіти і науки України. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню впливу фотобіомодуляційної терапії на біохімічні процеси у клітинах крові щурів за умов експериментального цукрового діабету.

Цукровий діабет – група метаболічних захворювань, які є наслідком дефектів секреції інсуліну, дії інсуліну або обох цих чинників, що призводить до підвищення рівня глюкози у крові. Хронічна гіперглікемія спричиняє порушення та пошкодження деяких органів та тканин зокрема очей, нирок, серця та кровоносних судин. Окрім того, для запобігання розвитку діабетичних ускладнень важливо не допустити розвиток оксидативного стресу. Для цього застосовують сполуки з антиоксидантними властивостями, наприклад поліфеноли. Наразі існує велика кількість препаратів, що призначені для контролю рівня глюкози у крові та полегшення стану пацієнта, проте такі препарати часто виявляються недостатньо ефективними та мають побічні ефекти. Тому надзвичайно важливим є пошук нових методів подолання гіперглікемії та полегшення супутніх ускладнень цукрового діабету, викликаних розвитком оксидативного стресу.

Фотобіомодуляційна терапія (ФБМТ, низькоінтенсивна світлова терапія) полягає у використанні світла видимої (іноді інфрачервоної) ділянки спектра для лікування багатьох патологічних станів або досягнення бажаного біологічного ефекту. Джерелом світла переважно є лазери з низькою потужністю або світлові діоди. Такий вид терапії є неінвазивним та демонструє низку позитивних ефектів (антибактеріальна, протизапальна та антиоксидантна дії, активація проліферації

клітин та синтезу колагену та ін.), що дозволяють її потенційне застосування для лікування діабетичних порушень.

Фотобіомодуляційна терапія в Україні наразі використовується для лікування широкого спектру захворювань, проте найчастіше лише як допоміжна ланка фізіотерапії. Повноцінному застосуванню, перш за все, перешкоджає недостатня з'ясованість молекулярних механізмів впливу фотобіомодуляційної терапії. Існує багато експериментальних досліджень, які повідомляють про позитивний вплив фотобіомодуляційної терапії на загоєння ран та запобігання бактеріальним інфекціям. Саме тому фотобіомодуляційну терапію часто застосовують у хірургії, хоча таке застосування багато в чому є емпіричним.

Перше, на що впливає гіперглікемія та оксидативний стрес – це система крові. Зміни у структурі мембран еритроцитів, порушення зв'язування кисню з гемоглобіном та модифікація механічних характеристик є наслідком впливу гіперглікемії на еритроцити. Надмірна або недостатня функціональна активність лейкоцитів призводить до підвищеної сприйнятливості до інфекцій у хворих на діабет. Хоча існує велика кількість досліджень антиоксидантних властивостей фотобіомодуляційної терапії, її вплив на систему крові за умов цукрового діабету залишається недостатньо дослідженим.

Зважаючи на вищевказані аргументи, дослідження впливу фотобіомодуляційної терапії на біохімічні процеси у організмі (та клітини крові зокрема) за норми та умов цукрового діабету дозволить з'ясувати молекулярні механізми дії фотобіомодуляційної терапії та обґрунтувати її застосування як ефективного та неінвазивного методу лікування цукрового діабету та його ускладнень.

Метою нашої роботи було дослідити біохімічні ефекти фотобіомодуляційної терапії за умов експериментального цукрового діабету.

У дисертаційній роботі досліджено вплив фотобіомодуляційної терапії на окремі гематологічні показники за умов цукрового діабету. Встановлено, що фотобіомодуляційна терапія позитивно впливає на роботу системи еритроциту, зокрема виявлено збільшення кількості еритроцитів та зменшення кількості

ретикулоцитів у щурів за умов ЕЦД та дії ФБМТ. Також встановлено підвищення стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов ЕЦД та дії ФБМТ. За дії ФБМТ також виявлено підвищення концентрації гемоглобіну та збільшення вмісту протопорфірину у крові щурів з ЦД. Підтверджено гіпотезу про те, що протопорфірин слугує хромофором для ФБМТ, опосередковуючи її біологічні ефекти.

Окрім того, встановлено роль ФБМТ у покращенні кисень-транспортної функції гемоглобіну за умов ЦД.

Досліджено вплив ФБМТ на розвиток оксидативно-нітративного стресу у клітинах крові щурів з ЕЦД. Встановлено коригуючу дію ФБМТ на прооксидантно/антиоксидантний баланс у клітинах крові щурів з ЕЦД. Виявлено зниження рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові, еритроцитах та лейкоцитах, проте вміст АФО у лейкоцитах щурів з ЕЦД за дії ФБМТ не змінювався. Встановлено підвищення активності каталази та СОД у лейкоцитах за дії ФБМТ.

Виявлено зниження вмісту ОМБ у лізатах лейкоцитів та АОРPs і AGEs у плазмі крові щурів з ЕЦД за дії ФБМТ. Виявлено зниження вмісту АОРPs і AGEs у лізатах лейкоцитів за ЕЦД та підвищення за умов ЕЦД та дії ФБМТ. Виявлено зниження рівня RAGE у плазмі крові щурів з ЕЦД за дії ФБМТ. Встановлено, що за умов ЕЦД та дії ФБМТ активність МПО змінюється різнонапрямлено: знижується у плазмі крові та зростає у лізатах лейкоцитів.

Встановлено, що за умов ЕЦД та дії ФБМТ знижується активність NOS (сумарна та iNOS) і рівень нітритів.

Досліджено вплив ФБМТ на глікемічний профіль організму та енергозабезпечення лейкоцитів за умов ЕЦД. Встановлено антигіперглікемічну активність ФБМТ. Виявлено, що за дії ФБМТ відбувається зниження концентрації глюкози у цільній крові та вмісту глікозильованого гемоглобіну у гемолізатах еритроцитів щурів, хворих на ЦД. Встановлено покращення толерантності організму тварин до навантаження глюкозою. Виявлено зниження активності поглинання флуоресцентного аналога глюкози 2-NBDG лейкоцитами

за умов ЕЦД та підвищення за дії ФБМТ. Встановлено зниження вмісту АТФ у лейкоцитах за умов ЕЦД та підвищення за дії ФБМТ.

Досліджено вплив ФБМТ на функціональний стан лейкоцитів щурів за умов ЕЦД. Встановлено, що ФБМТ нормалізує продукцію АФО лейкоцитами та активізує процес фагоцитозу, позитивно впливаючи на функціональний стан клітин. Виявлено підвищення активності фагоцитозу (фагоцитарного показника та індексу завершеності фагоцитозу) та продукції супероксиду нейтрофільними гранулоцитами за умов ЕЦД та дії ФБМТ.

У дисертаційній роботі з'ясовано біохімічні ефекти ФБМТ на систему крові щурів за умов ЕЦД. Це створює можливість для ширшого застосування ФБМТ як допоміжної терапії при лікуванні ЦД та його ускладнень. Пояснено гіпоглікемічний ефект ФБМТ, а також її нормалізуючий вплив на прооксидантно/антиоксидантний баланс завдяки фотодинамічному ефекту протопорфірину та функціональний стан лейкоцитів завдяки її здатності підвищувати поглинання глюкози клітинами та нормалізувати їхнє енергозабезпечення.

Всі дослідження, результати яких представлені у дисертаційній роботі, виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено пошук та аналіз наукової літератури, виконано основну частину експериментальної роботи та здійснено статистичну обробку отриманих результатів. Планування експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих даних, підготовка рукописів статей проводилося спільно з науковим керівником д.б.н. Сибірною Н.О.

Ключові слова: цукровий діабет, лейкоцити, еритроцити, оксидативний стрес, гіперглікемія, фотобіомодуляційна терапія, енергозабезпечення клітини, поглинання глюкози, фагоцитоз, бактерицидна активність.

SUMMARY

Karmash O.I. Biochemical effects of photobiomodulation therapy under experimental diabetes mellitus. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 – Biology). – Ministry of education and science of Ukraine. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2021.

This dissertation focuses on the influence of photobiomodulation therapy on biochemical processes in blood cells of rats with experimental diabetes mellitus.

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases, characterized by disorders in insulin secretion and activity that leads to increase of glucose level in blood. Chronic hyperglycemia causes the disorders and injuries of some organs and tissues in human body, in particular eyes, kidneys, heart and blood vessels. Nowadays, there are the great amount of drugs for controlling blood glucose level and relieving patients state. However, such drugs are often ineffective and have side effects. Besides these, for prevention the development of diabetic complications it is important to not allow the progression of oxidative stress. For this aim, compounds with antioxidant properties, e.g. polyphenols are often used. So, it is important to search new methods for overcoming hyperglycemia and relieving concomitant complications of diabetes, caused by development of oxidative stress.

Photobiomodulation therapy (PBMT, low-intensity light therapy) consist in usage of light in visible (sometimes infrared) part of spectrum. The light source is mainly low power lasers or light-emitting diodes. This type of therapy is noninvasive and demonstrate a number of positive effects (antibacterial, anti-inflammation and antioxidant actions, activation of cell proliferation and collagen synthesis etc.) allowing its potential application for treatment of diabetic disorders.

Photobiomodulation therapy in Ukraine is currently used for treatment of broad range of diseases, but predominantly only as supportive chain of physiotherapy. Full-fledged application, first of all, prevented by lack of clarity in molecular mechanisms

of photobiomodulation therapy effects. There are a lot of experimental researches reporting about positive effect of photobiomodulation therapy on wound healing and prevention of bacterial infections. That is why photobiomodulation therapy is often used in surgery, however such an application is largely empirical.

The first thing that is affected by hyperglycemia and oxidative stress is the blood system. Changes in the structure of erythrocyte`s membrane and modification of their mechanical characteristics, impairment of hemoglobin oxygen binding are consequences of hyperglycemia action on erythrocytes. Excessive or insufficient functional activity of leukocytes leads to higher susceptibility to infections in patients with diabetes. Although there are many studies considering antioxidant properties of photobiomodulation therapy, its effect on the blood system in diabetes remains insufficiently studied.

Given the above arguments, investigation of photobiomodulation therapy effects on biochemical processes in organism (in particular blood cells) under normal and diabetic conditions will allow to elucidate molecular mechanisms of its action and justify its use as effective and noninvasive method for treatment of diabetes and diabetic complications.

The aim of our work was to investigate biochemical effects of photobiomodulation therapy under conditions of experimental diabetes mellitus.

In the dissertation work the influence of photobiomodulation therapy on some hematological indices under conditions of diabetes mellitus is investigated. It is established that photobiomodulation therapy has a positive effect on the erythron system. In particular, the increase of erythrocytes number and decrease of reticulocytes number during EDM and PBMT action was revealed. It is also established the increase in resistance of erythrocyte membranes to the action of acid hemolytic under the conditions of EDM and the action of PBMT. PBMT also showed an increase in hemoglobin concentration and in the content of protoporphyrin in the blood of rats with EDM. We confirmed hypothesis about action of protoporphyrin as chromophore to mediate it`s biological effects.

Besides, it is established the role of PBMT in improvement of oxygen-carrying function of hemoglobin under conditions of EDM.

The effect of PBMT on the development of oxidative-nitrative stress in the blood cells of rats with EDM was studied. Corrective action of PBMT on pro-oxidative/anti-oxidative balance in blood cells of rats with EDM was established. The decrease in the level of lipid peroxidation products in blood plasma, erythrocytes and leukocytes was revealed, but the content of ROS in the leukocytes of rats with EDM did not change under the action of PBMT. An increase in the activity of catalase and SOD in leukocytes under the action of PBMT was found.

The decrease in the content of OMP in leukocytes lysates and AOPPs and AGEs in the blood plasma of rats with EDM under the action of PBMT was revealed. There was a decrease in the content of AOPPs and AGEs in leukocytes lysates during EDM and an increase under the conditions of EDM and the action of PBMT. The decrease in the level of RAGE in blood plasma of rats with EDM and under the action of PBMT was revealed. It was found that under the conditions of EDM and the action of PBMT, the activity of MPO changes in different directions: it decreases in blood plasma and increases in leukocyte lysates.

It is established that under the conditions of EDM and action of PBMT NOS activity (total and iNOS) and nitrite level decreases.

The influence of PBMT on the glycemic profile of the organism and energy supply of leukocytes under EDM conditions was studied. The antihyperglycemic activity of PBMT was established. The decrease in the concentration of glucose in whole blood and the content of glycosylated hemoglobin in hemolysates of rat erythrocytes under the conditions of EDM and PBMT action was revealed. Improved tolerance of animals to glucose loading has been established. The decrease in the absorption activity of the fluorescent glucose analogue 2-NBDG by leukocytes under EDM conditions and the increase under the action of PBMT was revealed. The decrease in the content of ATP in leukocytes under the conditions of EDM and the increase under the action of PBMT were established.

The influence of PBMT on the functional state of rat leukocytes under EDM conditions and PBMT action was investigated. It was found that PBMT normalizes the production of ROS by leukocytes and activates the process of phagocytosis, positively affecting the functional state of cells. The increase in the activity of phagocytosis (phagocytic index and phagocytosis completion index) and superoxide production by neutrophilic granulocytes under EDM conditions and PBMT action was revealed.

In the dissertation work the biochemical effects of PBMT on blood system of rats with EDM is found out. This creates an opportunity for the wider use of PBMT as adjunctive therapy in the treatment of diabetes and its complications. The hypoglycemic effect of PBMT, as well as its normalizing effect on prooxidant / antioxidant balance due to photodynamic action of protoporphyrin and functional state of leukocytes due to its ability to increase glucose uptake by cells and normalize their energy supply are explained.

All researches, the results of which are presented in the dissertation, performed in person or with the direct participation of the applicant. The author of the dissertation independently searched and analyzed the scientific literature, performed the main part of the experimental work and performed statistical processing of the obtained results. Planning of experimental researches, analysis and discussion of the obtained data, preparation of manuscripts of articles was carried out together with the supervisor Dr. Sybirna N.O.

Key words: diabetes mellitus, leukocytes, erythrocytes, oxidative stress, hyperglycemia, photobiomodulation therapy, cell energy supply, glucose absorption, phagocytosis, bactericidal activity.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Кармаш О.І., Люта М.Я., Єфіменко Н.В., Коробов А.М., Сибірна Н.О. / Вплив низькоінтенсивного світлового випромінювання на глікемічний профіль та фізико-хімічні характеристики еритроцитів за умов цукрового діабету у щурів. // Фізіол. Журн. – 2018. Т. 64(6). С. 68-76.
2. Karmash O.I., Liuta M.Ya., Korobov A.M., Sybirna N.O. / Effect of Photomodulation Therapy on Development of Oxidative Stress in Blood Leukocytes of Rats with Streptozocin-Induced Diabetes Mellitus. // Cyt. and Genet. – 2020. Vol. 54 (5). P. 456-464.
3. O. I. Karmash, M. Ya. Liuta, N. V. Yefimenko, N. O. Sybirna / The effect of photobiomodulation therapy on some indices of rats' blood cells functional state under experimental diabetes mellitus. // Biol. Stud. – 2021. Vol. 15(3). P. 3–16.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Люта М. Я. Біологічний ефект дії низькоінтенсивного червоного випромінювання за умов експериментального цукрового діабету / М. Я. Люта, Н. В. Єфіменко, О. І. Кармаш, А. М. Коробов, Н. О. Сибірна // Матеріали XLVII Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів у медицині та біології». – Київ. – 2017. – С. 84-86.
2. Кармаш О. Вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання на окремі показники крові щурів за умов експериментального цукрового діабету / О. Кармаш, М. Люта, А. Коробов, Н. Сибірна // Молодь і поступ біології: програма і тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (м. Львів, 10 – 12 квітня 2018 р.). – Львів. – 2018. – С. 94-95.

3. Калінік О. Аналіз змін показників стійкості еритроцитів щурів до дії кислотного гемолітика за умов експериментального цукрового діабету на фоні низькоінтенсивного електромагнітного опромінення. / О. Калінік, О. Кармаш, М. Люта, К. Дудок, А. Коробов, Н. Сибірна. // Молодь і поступ біології: програма і тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (м. Львів, 10 – 12 квітня 2018 р.). – Львів. – 2018. – С. 93-94.
4. Тершак С. Вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання на функціональну активність лейкоцитів щурів за експериментального цукрового діабету / С. Тершак, О. Кармаш, М. Люта, К. Дудок, А. Коробов, Н. Сибірна. // Молодь і поступ біології: програма і тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (м. Львів, 10 – 12 квітня 2018 р.). – Львів. – 2018. – С. 101-102.
5. Karmash O.I. Effect of photobiomodulation therapy on differential white blood cells count and leukocyte antioxidant activity in streptozotocin-induced diabetic rats / O.I. Karmash, M.Y. Liuta, A.M. Korobov, N.O. Sybirna // Materials XLIX International Scientific and Practical Conference “Application of Lasers in Medicine and Biology” and “2nd Gamaleia’s Readings”. – Kharkiv. – 2018. – P. 176-178.
6. Karmash O.I. The influence of photobiomodulation therapy on blood antioxidant system in rats with experimental diabetes mellitus / O.I. Karmash, M.Ya. Liuta, A.M. Korobov, N.O. Sybirna // Матеріали 50-ої ювілейної Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів у медицині та біології». – Харків. – 2019. – С. 135-136.
7. Кармаш О. Ефект фотобіомодуляційної терапії на стан антиоксидантної системи лейкоцитів крові щурів за умов цукрового

- діабету / О. Кармаш, П. Фоловко, А. Маслакова, М. Люта, А. Коробов, Н. Сибірна // «Молодь і поступ біології»: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса (м. Львів, 9-11 квітня 2019 р.): збірник тез. — Львів. — 2019. — С. 63-64.
8. Муяссарова К. Вплив низькоінтенсивного червоного випромінювання на показники оксидативного стресу у крові щурів за умов цукрового діабету / К. Муяссарова, О. Кармаш, Н. Єфіменко, М. Люта, А. Коробов, Н. Сибірна // «Молодь і поступ біології»: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса (м. Львів, 9-11 квітня 2019 р.): збірник тез. — Львів. — 2019. — С. 71-72.
 9. Кармаш О.І. Антидіабетичний ефект низькоінтенсивної світлової терапії / О.І. Кармаш, М.Я. Люта, А.М. Коробов, Н.О. Сибірна // Медична та клінічна хімія: Матеріали XII українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. – Тернопіль. – 2019. – Т.21. – № 3. – С.190.
 10. Маслакова А. Вплив фотобіомодуляційної терапії на рівень маркерів оксидативно-нітративного стресу за умов експериментального цукрового діабету / А. Маслакова, П. Фоловко, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27–29 квітня 2020 р. : збірник тез. – Львів, 2020. – С. 28–29.
 11. Муяссарова К. Ефект фотобіомодуляційної терапії на морфофункціональні властивості еритроцитів крові за умов стрептозоточин-індукованого цукрового діабету / К. Муяссарова, О. Гіжецька, Н. Єфіменко, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27–29 квітня 2020 р. : збірник тез. – Львів, 2020. – С. 31.

12. Гіжецька О. Кисеньтранспортна функція гемоглобіну за дії фотобіомодуляційної терапії у разі експериментального цукрового діабету / О. Гіжецька, Н. Єфіменко, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19–21 квітня 2021 р.). – Львів: ТОВ «Ромусполіграф», 2021. – С. 35-36.
13. Маслакова А. Вплив фотобіомодуляційної терапії на енергозабезпечення й активність мієлопероксидази лейкоцитів щурів за цукрового діабету / А. Маслакова, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19–21 квітня 2021 р.). – Львів: ТОВ «Ромусполіграф», 2021. – С. 40-41.
14. Маслакова А.О. Вплив фотобіомодуляційної терапії на розвиток оксидативно-нітративного стресу в еритроцитах та плазмі крові щурів за експериментального цукрового діабету / А.О. Маслакова, О.І. Кармаш, М.Я. Люта, Н.О. Сибірна // Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії: матеріали науково-практичної on-line конференції з міжнародною участю (м. Харків, 01 жовтня 2021 р.). – Харків, 2021. – С. 178–180.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- 2-NBDG – 2-дезоксид-2-((7-нітро-2,1,3-бензоксидіазол-4-іл)-аміно)-
Д- глюкоза
- AGEs – кінцеві продукти глікації білків
- ALA – амінолевулінова кислота
- ALAS – синтаза амінолевулінової кислоти
- AOPPs – кінцеві продукти оксидації білків
- GSH – відновлений глутатіон
- HbA1c – глікозильований гемоглобін
- NOS – синтаза оксиду Нітрогену (NO-синтаза)
- PKC – протеїнкіназа C
- PPIX – протопорфірин IX
- RAGE – рецептор до кінцевих продуктів глікації
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФО – активні форми Оксигену
- ДНФГ – динітрофенілгідразин
- ЕЦД – експериментальний цукровий діабет
- iNOS – індукцибельна NO-синтаза
- ІЗФ – індекс завершеності фагоцитозу
- КДО – крива дисоціації оксигемоглобіну
- МПО – мієлопероксидаза
- ОМБ – окисно модифіковані білки
- ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
- СОД – супероксиддисмутаза
- СЦК – середній цитохімічний коефіцієнт
- ТБК – тіобарбітурова кислота
- ТБК-пп – ТБК-позитивні продукти
- ТХО – трихлороцтова кислота
- ФБМТ – фотобіомодуляційна терапія
- ФП – фагоцитарний показник

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Актуальність теми

Цукровий діабет – група метаболічних захворювань, які характеризуються порушенням секреції або дії інсуліну, що призводить до підвищення рівня глюкози у крові. Пацієнти з діабетом мають підвищений ризик серйозних ускладнень зі здоров'ям, включаючи інфаркт міокарда, інсульт, ниркову недостатність, втрату зору та передчасну смерть. Цукровий діабет та його ускладнення залишаються однією із провідних причин смертності. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, до 2030 року смертність, пов'язана з діабетом, подвоїться. Основною метою терапії ЦД є досягнення оптимального глікемічного контролю шляхом зміни дієти та способу життя та застосування відповідних ліків разом із регулярним контролем рівня глюкози в крові. Наразі існує велика кількість препаратів, що призначені для контролю рівня глюкози у крові та полегшення стану пацієнта, проте такі препарати часто виявляються недостатньо ефективними та мають побічні ефекти. Наприклад, деякі антидіабетичні ліки можуть викликати важкі ускладнення серцево-судинної системи, а найпоширеніший цукрознижувальний препарат метформін може спричинити дефіцит вітаміну В12, фолієвої кислоти та викликати порушення у функціонуванні травної системи [32].

Хоча ожиріння та нестача фізичної активності, як відомо, є основними факторами ризику, останні дані свідчать про те, що оксидативний стрес може сприяти патогенезу ЦД шляхом збільшення резистентності до інсуліну або порушення його секреції. Тому для запобігання розвитку діабетичних ускладнень важливо не допустити розвиток оксидативного стресу. Для цього застосовують сполуки з антиоксидантними властивостями, наприклад поліфеноли [22]. Отже, надзвичайно важливим є пошук нових методів подолання

гіперглікемії та полегшення супутніх ускладнень цукрового діабету, викликаних розвитком оксидативного стресу.

Фотобіомодуляційна терапія (ФБМТ, низькоінтенсивна світлова терапія) полягає у використанні світла видимої (іноді інфрачервоної) ділянки спектра. Джерелом світла переважно є лазери з низькою потужністю або світлові діоди. Такий вид терапії є неінвазивним та демонструє низку позитивних ефектів (антибактеріальна, протизапальна та антиоксидантна дії, активація проліферації клітин та синтезу колагену та ін.), що дозволяють її потенційне застосування для лікування діабетичних порушень [38].

Фотобіомодуляційна терапія в Україні наразі використовується для лікування широкого спектру захворювань, проте найчастіше лише як допоміжна ланка фізіотерапії. Повноцінному застосуванню, перш за все перешкоджає недостатня з'ясованість молекулярних механізмів впливу фотобіомодуляційної терапії. Існує багато експериментальних досліджень, які повідомляють про позитивний вплив фотобіомодуляційної терапії на загоєння ран та запобігання бактеріальним інфекціям. Саме тому фотобіомодуляційну терапію часто використовують при загоєнні ран, хоча таке застосування багато в чому є емпіричним [63].

Перше, на що впливає гіперглікемія та оксидативний стрес – це система крові. Зміни у структурі мембран еритроцитів, порушення зв'язування кисню з гемоглобіном та модифікація механічних характеристик є наслідком впливу гіперглікемії на еритроцити [66]. Надмірна або недостатня функціональна активність лейкоцитів призводить до підвищеної сприйнятливості до інфекцій у хворих на діабет [81; 115]. Хоча існує велика кількість досліджень антиоксидантних властивостей фотобіомодуляційної терапії, її вплив на систему крові за умов цукрового діабету залишається недостатньо дослідженим.

Зважаючи на вищевказані аргументи, дослідження впливу фотобіомодуляційної терапії на біохімічні процеси у організмі (та клітинах крові зокрема) за норми та умов цукрового діабету дозволить з'ясувати молекулярні механізми дії фотобіомодуляційної терапії та обґрунтувати її застосування як

ефективного та неінвазивного методу лікування цукрового діабету та його ускладнень.

Мета роботи і завдання дослідження – дослідити біохімічні ефекти фотобіомодуляційної терапії за умов експериментального цукрового діабету, зокрема її вплив на окремі гематологічні показники, маркери розвитку оксидативно-нітративного стресу, глікемічний профіль організму, енергозабезпечення і функціональний стан лейкоцитів крові щурів.

Об'єктом дослідження є фотобіомодуляційна терапія у вигляді світла з довжиною хвилі 630-660 нм, джерелом якого була матриця із надяскравих світлодіодів.

Предметом дослідження є біохімічні ефекти фотобіомодуляційної терапії (гіпоглікемічна дія, вміст та кисень-транспортна функція гемоглобіну, цитологічна характеристика крові, активність ферментів антиоксидантного захисту, вміст маркерів розвитку оксидативно-нітративного стресу, енергозабезпечення та функціональна активність лейкоцитів).

Методи досліджень: біохімічні (визначення концентрації глюкози у крові, активності ензимів антиоксидантного захисту, вмісту гемоглобіну, протопорфірину, глікозильованого гемоглобіну, продуктів ПОЛ, ОМБ, кінцевих продуктів оксидації та глікації білків, нітрит-аніонів, АТФ), цитологічні (визначення кількості еритроцитів та лейкоцитів, морфологічні дослідження формених елементів крові, визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика, активності поглинання глюкози, вмісту АФО, фагоцитарної та бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів), фізико-хімічні (електрофорез білків у градієнті концентрації акриламідру, визначення спорідненості гемоглобіну до кисню), імунологічні (імунодетекція білків), статистичні методи.

Завдання:

1. Оцінити вплив ФБМТ на окремі цитологічні показники крові щурів з ЕЦД (зокрема на кількість еритроцитів та їхню стійкість до дії кислотного гемолітика, кількість ретикулоцитів, а також на лейкоцитарну формулу

крові). Дослідити вплив ФБМТ на концентрацію та функціональні властивості гемоглобіну, а також на рівень його попередника – протопорфірину.

2. Дослідити вплив ФБМТ на маркерні показники розвитку оксидативно-нітративного стресу (вміст АФО, стабільних метаболітів NO, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків).
3. Вивчити вплив ФБМТ на активність ферментів антиоксидантного захисту (каталаза, СОД), а також ферментів, пов'язаних із прогресією нітративного стресу (NOS та iNOS).
4. Визначити гіпоглікемічну здатність ФБМТ (зміни концентрації глюкози та глікозильованого гемоглобіну, а також толерантності організму до глюкозного навантаження) та її вплив на енергозабезпечення лейкоцитів крові щурів з ЕЦД (активність поглинання глюкози та вміст АТФ у клітині).
5. Оцінити вплив ФБМТ на фагоцитарну (ФП та ІЗФ) та бактерицидну (рівень продукції супероксиду та активність МПО) активність нейтрофілів щурів за умов ЕЦД.

Зв'язок даної роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках теми «Фотобіомодуляційна дія низькоінтенсивного світлового випромінювання оптичного діапазону спектра на систему крові щурів за умов цукрового діабету 1-го типу» (№ державної реєстрації 0119U002324).

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі показано позитивний вплив ФБМТ на систему еритроциту у щурів з ЕЦД. Встановлено збільшення кількості еритроцитів та зменшення кількості ретикулоцитів, покращення структурно-функціонального стану мембран еритроцитів та зміни у лейкоцитарній формулі крові. Показано збільшення концентрації гемоглобіну, покращення його кисень-транспортної

функції. Перевірено запропоновану нами гіпотезу щодо ролі протопорфірину як первинного фотоакцептора за дії ФБМТ.

Продемонстровано вплив ФБМТ на розвиток оксидативно-нітративного стресу. Показано зниження рівня ПОЛ, та ОМБ (нейтрального та основного характеру). Не виявлено змін у кількості АФО у лейкоцитах крові щурів з ЕЦД за дії ФБМТ. Показано зниження вмісту АОРPs та AGEs за умов ЕЦД у лейкоцитах та підвищення цих показників за умов ЕЦД та дії ФБМТ. Виявлено підвищення рівня AGEs та RAGE у плазмі крові за ЕЦД та зниження цих показників за умов ЕЦД та дії ФБМТ. Показано коригуючий вплив ФБМТ на ензиматичну ланку системи антиоксидантного захисту, зокрема виявлено підвищення активності каталази, СОД, а також зниження активності сумарної та індукцибельної NO-синтази – основного ферменту відповідального за розвиток нітративного стресу.

Підтверджено гіпоглікемічний ефект ФБМТ. Виявлено покращення толерантності до глюкози за дії ФБМТ. Експериментально обгрунтовано гіпоглікемічну дію ФБМТ, а також підвищення рівня АОРPs та AGEs у лейкоцитах за умов ЦД та дії ФБМТ. Показано, що це пов'язане із рівнем поглинання глюкози клітинами (лейкоцитами). Виявлено підвищення вмісту АТФ у лейкоцитах за умов ЦД та дії ФБМТ, що свідчить про покращення енергозабезпечення цих клітин.

Показано позитивний вплив ФБМТ на функціональний стан лейкоцитів щурів за умов ЕЦД. Зокрема виявлено підвищення активності фагоцитозу у нейтрофільних гранулоцитах та покращення їхньої бактерицидної активності (збільшення продукції супероксиду та підвищення активності МПО).

Практичне значення отриманих результатів

З'ясовано біохімічні ефекти ФБМТ на систему крові щурів за умов ЕЦД. Зокрема виявлено вплив ФБМТ на систему еритронону та покращення кисень-транспортної функції гемоглобіну.

Підтверджено нормалізуючий вплив ФБМТ на прооксидантно/антиоксидантний баланс організму щурів за умов ЕЦД. Показано зниження рівня оксидативно-нітративного стресу у лейкоцитах щурів за умов ЕЦД.

Пояснено гіпоглікемічний ефект ФБМТ, а також її вплив на функціональний стан лейкоцитів завдяки її здатності підвищувати поглинання глюкози клітинами та нормалізувати їхнє енергозабезпечення. Підтверджено гіпотезу про те, що протопорфірин слугує хромофором для ФБМТ, опосередковуючи її біологічні ефекти.

Отримані результати обґрунтовують необхідність ширшого застосування ФБМТ як допоміжної терапії при лікуванні ЦД та його ускладнень.

Особистий внесок здобувача

Всі дослідження, результати яких представлені у дисертаційній роботі, виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено пошук та аналіз наукової літератури, виконано основну частину експериментальної роботи та здійснено статистичну обробку отриманих результатів. Планування експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих даних, підготовка рукописів статей проводилося спільно з науковим керівником д.б.н. Сибірною Н.О.

Всі розділи дисертації написані автором самостійно.

Апробація результатів дисертації

Основні та додаткові положення дисертації було апробовано на засіданнях та семінарах кафедри біохімії біологічного факультету ЛНУ ім. Івана Франка. Результати досліджень було також представлено на 8 фахових міжнародних конференціях:

1. XLVII Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології», Київ, 12-14 жовтня 2017 р.

2. XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, Львів, 10-12 квітня 2018 р.
3. XLIX International Scientific and Practical Conference «Application of Lasers in Medicine and Biology» and «2nd Gamaleia's Readings», Kharkiv, October 3-7, 2018.
4. 50-а ювілейна міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології», Харків, 22-25 травня 2019 р.
5. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса, Львів, 9-11 квітня 2019 р.
6. XII український біохімічний конгрес, Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.
7. XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 27–29 квітня 2020 р.
8. XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 19–21 квітня 2021 р.

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті: 2 статті у міжнародних виданнях з квантилем Q4, а також 1 статтю в українському фаховому журналі з квантилем Q4.

Структура та обсяг роботи

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури.

Дисертацію викладено на _ сторінках машинного тексту, вона містить _ рисунків та _ таблиць, _ пунктів цитованої літератури.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні механізми розвитку цукрового діабету

Цукровий діабет (ЦД) як захворювання, що характеризується втратою ваги і поліурією вперше був задокументований у Древньому Єгипті, однак сам термін цукровий діабет (*diabetes mellitus*) запропонував грецький лікар Ертеус. Грецькою мовою *diabetes* означає «проходити крізь», а *mellitus* – це латинське слово на позначення меду (мається на увазі солодкість).

З розвитком індустріалізації у всьому світі та приголомшливим зростанням випадків ожиріння, ЦД проявився як глобальна епідемія. Однак отримати точний показник поширення та прогноз зростання випадків цього захворювання досить важко. Цьому є дві причини: стандартизація та методи збору даних широко варіюються в різних частинах світу, зокрема останні опитування прогнозують збільшення поширеності діабету серед дорослих з 4% у 1995 р. до 6,4% у 2025 р. Другою, і водночас найбільш тривожною причиною є те, що наразі близько 50% хворих на ЦД залишаються недіагностованими [73].

Визначальною особливістю діабету є наявність гіперглікемії. Хронічна гіперглікемія за ЦД призводить до порушень вуглеводного, жирового та білкового обмінів і пов'язана з тривалими пошкодженнями, дисфункцією та відмовою різних органів, особливо очей, нирок, нервової тканини, серця та судин. [15]. Донедавна переважала концептуальна класифікація із двома основними типами ЦД: аутоімунний (тип 1) та неаутоімунний (тип 2), проте такий розподіл є неточним, оскільки відсутня чітка етіологія розвитку цих типів ЦД. Кожен інший метаболічний розлад регуляції глюкози класифікували як особливу категорію діабету (в основному пов'язану з типом 2), наприклад, моногенний, гестаційний, індукований стероїдами, пов'язаний з муковісцидозом, постпанкреатектомічний, асоційований з акромегалією, асоційований з вірусами гепатиту С та ВІЛ, та ін. [119].

ЦД 1-го типу, як правило, є аутоімунним за етіологією і характеризується наявністю хоча б 1 з 4 аутоантитіл до антигенів β -клітин, включаючи антитіла до

острівцевих клітин, до декарбоксилази глютамінової кислоти-65 (GAD65), до інсулінома-асоційованого антигену-2 та аутоантитіла до інсуліну [17].

Вперше аутоантитіла, які зв'язуються зі специфічними білками, що знаходяться в клітинах панкреатичних острівців, були описані більш ніж 30 років тому [26]. Хоча існують певні суперечки щодо визначення «аутоімунного» захворювання, наявність аутоантитіл, відтворення аутоімунного захворювання у експериментальних тварин та подібність імунопатологічних уражень експериментального захворювання із природнім, все це свідчить про аутоімунність. Наразі аутоімунність вважається етіологічною причиною ЦД 1-го типу, однак не основною [87]. Хвороба проявляється у генетично схильних осіб, ймовірно, як результат впливу чинників середовища. Імунна система атакує β -клітини острівців Лангерганса підшлункової залози, знищуючи або пошкоджуючи їх настільки, щоб зменшити і врешті-решт припинити вироблення і секрецію інсуліну. Незважаючи на різноманітні дослідження аутоімунної природи ЦД 1-го типу, залишаються питання щодо тривалості та природи деструкції β -клітин.

Вважається, що клінічний початок ЦД 1-го типу є поєднанням руйнування і втрати функцій β -клітин. Однак розуміння того, як виникають порушення метаболізму β -клітин під час патогенезу захворювання, залишається неповним [119].

Два гаплотипи HLA класу 2 (*DR3* та *DR4-DQ8*), які беруть участь у презентації антигенів, пов'язані приблизно із 50% спадковості захворювання та є поширеними серед білих людей. Механізми, за якими саме ці гаплотипи HLA взаємодіють та впливають на ризик розвитку ЦД 1-го типу, недостатньо з'ясовані. Загальногеномні дослідження також виявили понад 60 додаткових локусів, не пов'язаних з HLA, які асоційовані з ризиком розвитку ЦД 1-го типу. Ці варіанти були переважно пов'язані з імунною системою. Серед них виділяють шляхи, важливі при розвитку ЦД 1-го типу – наприклад, експресія гена інсуліну в тимусі, регуляція активації Т-клітин та відповідь імунної системи на вірусні інфекції [95].

Останнім часом спостерігається збільшення захворюваності на ЦД 1-го типу серед дітей молодше 15 років. Це збільшення не можна пояснити генетичними змінами, що дозволяє припустити вплив факторів навколишнього середовища чи способу життя, або обох цих чинників. Багато чинників навколишнього середовища пов'язані з ЦД 1-го типу, включаючи дієту, недостатнє надходження вітаміну D, вплив в ранньому віці вірусів, пов'язаних із запаленням острівців (наприклад, ентеровіруси), та зменшення різноманітності мікрофлори в кишечнику. Ожиріння також асоціюється зі збільшенням ризику прояву ЦД 1-го типу, таким чином стрес β -клітин може потенційно слугувати підґрунтям розвитку цього захворювання. Великі відмінності у поширенні захворюваності на ЦД 1-го типу у генетично подібних популяціях, які розділені соціально-економічними межами та зростаюча частота ЦД 1-го типу у осіб із відсутністю генів ризику підкреслюють важливість факторів навколишнього середовища.

Патогенез ЦД 1-го типу є результатом складної взаємодії між β -клітинами підшлункової залози та вродженою і адаптивною ланками імунної системи. Вважається, що розвиток ЦД 1-го типу ініціюється презентацією β -клітинних пептидів антигенпрезентуючими клітинами (АПК). АПК, що несуть ці аутоантигени, мігрують до лімфатичних вузлів підшлункової залози, де вони взаємодіють з аутореактивними $CD4^+$ Т-лімфоцитами, які в свою чергу опосередковують активацію аутореактивних $CD8^+$ Т-клітин. Ці активовані $CD8^+$ Т-клітини повертаються до острівців підшлункової залози та лізують β -клітини, експресуючи імуногенні аутоантигени на поверхневих молекулах головного комплексу гістосумісності класу I. Деструкція β -клітин ще більше посилюється завдяки вивільненню прозапальних цитокінів та активних форм Оксигену із імунних клітин вродженої ланки імунітету (макрофагів, натуральних клітин-кілерів та нейтрофілів). Весь цей процес посилюється дефектами регуляторних Т-лімфоцитів, які не здатні ефективно пригнічувати аутоімунність. Активовані Т-клітини в лімфовузлах підшлункової залози також стимулюють В-лімфоцити

для вироблення аутоантитіл проти β -клітинних білків. Ці аутоантитіла вважаються визначальним біомаркером ЦД 1-го типу.

Питання про те, чи існує конкретний тригер для імунної атаки β -клітин, або аутоімунна відповідь є випадковою стохастичною подією, був предметом значних спекуляцій та суперечок. Для кількох вірусних інфекцій виявлений зв'язок з ЦД 1-го типу, зокрема ентеровірус є однією з найбільш часто асоційованих інфекцій. Ентеровірусний основний капсидний білок VP1 та його РНК були виявлені у острівцях підшлункової залози людей із недавно діагностованим ЦД 1-го типу, поряд з гіперекспресією молекул основного комплексу гістосумісності класу 1. Одна з можливостей патогенезу ЦД 1-го типу полягає в тому, що деякі люди мають атипову, хронічну вірусну інфекцію β -клітин, що призводить до хронічного запалення та розвитку аутоімунітету [76].

Загальновідомо, що пацієнти з ЦД 1-го типу мають знижену активність функціонування β -клітин у порівнянні зі здоровими людьми. З ослабленням гіперглікемії ці β -клітини можуть частково відновити секрецію інсуліну, що призводить до так званого періоду «медового місяця» після діагностики, що характеризується мінімальною потребою введення екзогенного інсуліну. З часом, багато з цих залишкових клітин втрачаються. Однак, аналіз зрізів підшлункової залози у осіб з довгостроковим ЦД 1-го типу виявив наявність залишкових β -клітин через десятиліття після діагностування хвороби. Окрім того, дослідження рівня С-пептиду показали, що 30–80% людей із довготривалим перебігом ЦД 1-го типу є мікросекреторами інсуліну [97; 75]. Отже, хоча кількість і функція ендогенних β -клітин зменшуються пропорційно до збільшення тривалості захворювання, це зниження не прогресує до повної втрати всіх β -клітин. Цей висновок заслуговує на увагу, оскільки стійка секреція С-пептиду була пов'язана зі зменшенням розвитку ретинопатії та нефропатії. Крім того, така стійка секреція С-пептиду у людей з довготривалим ЦД 1-го типу може покращити реакцію глюкагону на гіпоглікемію. Проте варто зауважити, що аналіз зразків підшлункової залози не виявили ані посилення неогенезу, ні проліферації β -клітин у донорів із ЦД 1-го типу. Таким чином механізм, за яким

у хворих на ЦД 1-го типу зберігаються залишкові β -клітини є не до кінця зрозумілим. Визначення шляхів, які дозволили цим клітинам уникнути аутоімунної атаки, може дати розуміння нових терапевтичних підходів [80; 42].

У 1936 р. Хімсворт заперечив уявлення про те, що ЦД – це просто хвороба, що характеризується дефіцитом інсуліну, і запропонував диференціювати його на підтипи на основі чутливості периферичних тканин до інсуліну. Ця концепція отримала підтримку у 1960 р., коли Ялов і Берсон виявили, що дорослі пацієнти з ЦД мали підвищений рівень циркулюючого інсуліну. На основі цих досліджень ЦД розділили на 2 різні діабетичні патології: інсулінозалежний діабет (нині відомий як ЦД 1-го типу) та неінсулінозалежний діабет (нині ЦД 2-го типу) [56; 132].

Відповідно до цієї зростаючої складності, у 1987 р. Дефронцо висловив ідею, що ЦД 2-го типу є наслідком порушення функціонування β -клітин підшлункової залози, м'язів та печінки. Дефронцо зазначив, що у хворих на ЦД 2-го типу із нормальною вагою існує специфічний взаємозв'язок між концентрацією глюкози натще і середнім вмістом інсуліну протягом 2 годин орального глюкозотолерантного тесту (ОГТТ). Коли концентрацію глюкози в плазмі натще, яка є показником розвитку ЦД, наносять на графік відносно до середньої концентрації інсуліну у відповідь на ОГТТ із введенням 100 г глюкози, отримують характерну криву, у вигляді перевернутої літери U. До прикладу, особа із концентрацією глюкози натще 80 мг/дл матиме середню концентрацію інсуліну в плазмі близько 50 $\mu\text{U}/\text{мл}$ протягом 2 год після прийому глюкози. Коли здорова людина починає хворіти на ЦД, і концентрація глюкози в плазмі крові натще зростає, β -клітини розпізнають, що механізм підтримки гомеостазу глюкози порушений, і збільшують секрецію інсуліну, намагаючись подолати порушення обміну глюкози. Таким чином, особа з глюкозою натще 120 мг/дл (тобто з порушеною толерантністю до глюкози або раннім ЦД) буде виділяти приблизно вдвічі більше інсуліну, ніж нормальна людина з концентрацією глюкози натще 80 мг/дл. Однак як тільки концентрація глюкози натще перевищує 120 мг/дл, β -клітини більше не здатні підтримувати підвищену

секрецію інсуліну, тому подальші збільшення концентрації глюкози в плазмі пов'язані з поступовим зниженням секреції інсуліну. Таким чином, хворий на ЦД з глюкозою натще 150-160 мг/дл буде виділяти кількість інсуліну, подібну до такої у здорової людини. Нарешті, коли базальний рівень глюкози перевищує 200-220 мг/дл, секреція інсуліну помітно спадає (рис. 1). Тим не менше, постабсорбційна швидкість секреції інсуліну залишається підвищеною, а гіперінсулінемія натще характерна для хворих на ЦД [40].

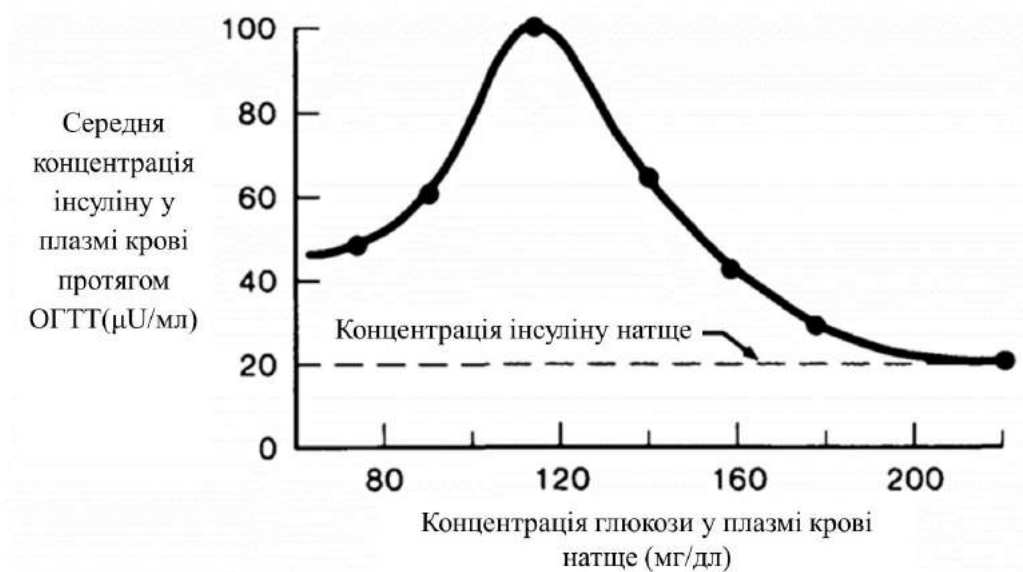


Рис. 1. Відношення середньої концентрації інсуліну у плазмі крові протягом ОГТТ ($\mu\text{U}/\text{мл}$) до концентрації глюкози у плазмі крові натще (мг/дл).

На додаток до непропорційної інсулінової відповіді у пацієнтів з ЦД 2-го типу, біологічні ефекти інсуліну притупляються по всьому тілу. Іншими словами, пацієнти з ЦД 2-го типу є резистентними до інсуліну, що ще більше збільшує потреби у його синтезі β -клітинами. Дефронцо відзначив вплив інсулінорезистентності на периферичну м'язову тканину та печінку (яку, разом із підшлунковою залозою, він називав «тріумвіратом»). На відміну від здорових людей, поглинання глюкози у відповідь на інсулін помітно знижується в периферичній м'язовій тканині пацієнтів з ЦД 2-го типу. Крім того, виявлено, що глюконеогенез в печінці є підвищеним, незважаючи на гіперінсулінемію натще, що демонструє резистентність до інсуліну в печінці. Механізм цієї

інсулінорезистентності на той час був невідомий, проте було очевидно, що ЦД 2-го типу є мультисистемним розладом [29].

Пізніше, у світлі зростаючого розуміння складності ЦД 2-го типу, модель «тріумвірату» було розширено до «зловісного октету», адже було досліджено роль адипоцитів, шлунково-кишкового тракту, α -клітин підшлункової залози, нирок та мозку, разом з м'язами, печінкою та β -клітинами в патогенезі ЦД 2-го типу [39]. У жирових клітинах здорових людей, інсулін інгібує ліполіз, тим самим пригнічуючи вивільнення вільних жирних кислот. У пацієнтів з ЦД 2-го типу інсулінорезистентність перешкоджає дії інсуліну на жирові клітини, що призводить до посиленого ліполізу та підвищення концентрації вільних жирних кислот у крові. Надлишок вільних жирних кислот спричиняє ліпотоксичність, що додатково сприяє підвищенню резистентності до інсуліну [72]. Крім того, у кишечнику ентероендокринальними L-клітинами виділяється гормон інкретин, зокрема глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1), що здатен активувати рецептори на β -клітинах підшлункової залози. Ці рецептори, пов'язані з G-білками, стимулюють секрецію інсуліну при підвищеному рівні глюкози в плазмі, беручи участь у постпрандіальному виділенні інсуліну. GLP-1 також діє на α -клітини підшлункової залози, зменшуючи секрецію глюкагону та затримуючи спорожнення шлунку. У пацієнтів з ЦД 2-го типу ефект інкретину знижений, що потенційно може відображати уже аномально змінену секрецію інсуліну та глюкагону у таких хворих [64; 94].

Відомо, що за ЦД також вражаються α -клітини підшлункової залози, однак хворі особи можуть мати неочікувано високі рівні глюкагону, особливо враховуючи, що секреція цього гормону зазвичай пригнічується за наявності гіперглікемії та гіперінсулінемії. Глюкагон секретується α -клітинами і по суті протидіє впливу інсуліну, збільшуючи продукцію глюкози печінкою та забезпечуючи надходження глюкози в мозок. У пацієнтів з ЦД 2-го типу інфузія соматостатину (який пригнічує секрецію як інсулін, так і глюкагону) зменшує синтез глюкози в печінці. Окрема інфузія соматостатину з інсуліном (спільно пригнічуючи ефекти глюкагону) ще більше зменшує синтез глюкози в печінці.

Ці спостереження пов'язують глюкагон із пропорційним вивільненням глюкози печінкою і, зокрема, пов'язують підвищену продукцію глюкози печінкою, що спостерігається при ЦД 2-го типу, із підвищеним вмістом глюкагону. Усе це разом вказує на те, що дисфункція α -клітин є ключовим фактором гіперглікемії натще [47].

Крім того, амелін, який виділяється з β -клітин підшлункової залози разом з інсуліном, здатен пригнічувати вивільнення глюкагону з α -клітин та затримувати спорожнення шлунку, запобігаючи різкому постпрандіальному підвищенню концентрації глюкози у крові. По мірі сильнішого порушення секреторної функції β -клітин протягом розвитку ЦД 2-го типу, секреція амеліну також знижується, що сприяє-розвиткові гіперглікемії [99].

Відомо, що глюкоза фільтрується нирками, і майже вся вона згодом реабсорбується, здебільшого, через котранспортер натрію-глюкози 2 (SGLT-2). У здорових людей, якщо рівень глюкози в крові зростає вище максимальної здатності транспорту SGLT-2, надлишок її виводиться із сечею. Існують дані про те, що у пацієнтів з ЦД 2-го типу експресія SGLT-2, а також поріг виведення надлишку глюкози збільшуються, що змушує нирки продовжувати реабсорбцію глюкози, незважаючи на її підвищений рівень в плазмі, а не виводити її із сечею [128].

Окрім того, навіть мозок зазнає впливу інсулінорезистентності, хоча механізм цього менш чіткий. Дослідження на щурах показало, що активація передачі сигналів інсуліну у гіпоталамус необхідна для того, щоб інсулін гальмував ендогенну продукцію глюкози. Таким чином, резистентність до інсуліну в гіпоталамусі може порушити підтримку гомеостазу глюкози та сприяти патогенезу ЦД 2-го типу [96].

Ускладнення ЦД вражають майже всі тканини тіла, і він є однією з основних причин розвитку серцево-судинних захворювань та смертності від них, сліпоті, ниркової недостатності та ампутацій [111].

Ускладнення від діабету можна класифікувати як мікрovasкулярні та макроваскулярні. Мікрovasкулярні ускладнення включають ураження нервової

системи (нейропатія), пошкодження нирок (нефропатія) та очей (ретинопатія). До макроваскулярних ускладнень належать серцево-судинні захворювання, інсульт та ураження периферичних судин. Пошкодження периферичних судин можуть призводити до синців або травм, які не загоюються, гангрені та, зрештою, ампутації. Статистичні дані вказують, що мікроваскулярні ускладнення є значно поширенішими, аніж макроваскулярні. Загалом діабетичні ускладнення можуть бути епізодичними, які є виліковними і можуть виникати декілька разів, та прогресуючими, які зазвичай розпочинаються легкими симптомами, проте з часом спричиняють значні пошкодження тканин та органів і, переважно, є незворотними. Інші ускладнення включають захворювання ротової порожнини, зниження стійкості до інфекцій, а також макросомію та інші ускладнення при народженні серед вагітних жінок з ЦД. Хоча типи ускладнень є подібними для хворих на ЦД 1-го і 2-го типу, частота або час виникнення можуть варіюватися [41].

Кожен з цих типів ускладнень має багато механізмів розвитку, однак схоже що вони мають один спільний елемент: тривале збільшення продукції АФО. За нормальних умов АФО регулюється циркадними ритмами та метаболічними мережами, а різні види АФО функціонують як сигнальні молекули, необхідні для підтримки нормального клітинного гомеостазу [49]. Навпаки, утворення АФО на занадто високому рівні, занадто довго, або у неналежному місці призводить до порушення функції клітин та розвитку різноманітних патологій [93].

1.1.1. Розвиток оксидативного стресу у клітинах крові

Відомо, що ЦД впливає на функціональний стан клітин крові. Зокрема, зміни у мембранах еритроцитів, порушення зв'язування кисню гемоглобіном та модифікація форми клітин через зміни організації цитоскелету є наслідком впливу гіперглікемії на еритроцити. В той же час, змінена сприйнятливість до інфекції хворих на ЦД пов'язана з порушенням функції поліморфно-ядерних лейкоцитів. ЦД також спричиняє значні зміни у метаболізмі лімфоцитів. Пацієнти з ЦД та гострим коронарним синдромом мають більший ризик серцево-

судинних ускладнень та повторних ішемічних явищ у порівнянні із здоровими людьми. Це може бути спричиненим різними механізмами, включаючи дисфункцію ендотелію, гіперактивність тромбоцитів та зміни у процесах згортання та фібринолізу [117]. Таким чином, вплив ЦД на систему крові відповідальний за розвиток більшості ускладнень.

Як зазначалося вище, окиснювальний стрес у клітинах та тканинах відіграє важливу роль у патогенезі ЦД. Внутрішньоклітинна гіперглікемія спричиняє надмірне утворення АФО, збільшуючи витік електронів з мітохондріального ланцюга транспорту електронів. Ці процеси можуть бути посилені шляхом АФО-індукованого роз'єднання димерів синтази оксиду азоту (eNOS) до мономерів та активацією NADPH-оксидаз. Підвищення пулу мітохондріальних АФО спричиняє дволанцюгові розриви ДНК за участі гідроксил радикалів, котрі формуються завдяки взаємодії іонів Феруму, вивільнених з феритину, та H_2O_2 . Ці розриви ДНК активують латентну ядерну полі-(АДФ-рибозо) полімераза (PARP). Полі-АДФ-рибозилування гліцеральдегід-3-дегідрогенази (GAPDH) за допомогою PARP призводить до часткового інгібування цього ключового гліколітичного ферменту та накопичення проміжних продуктів гліколізу. Таке накопичення спричиняє порушення різноманітних сигнальних та метаболічних шляхів у клітині, зокрема посилюється перетворення глюкози у сорбітол за допомогою ферменту AKR1B1, збільшується продукція метилглюксалу, основного попередника кінцевих продуктів глікозилювання (AGEs), активується ізоформи β , δ та θ протеїнкінази C та посилюються процеси окисної модифікації білків [113].

Окрім того, надмірна продукція АФО активує GS3K β , що знижує внутрішньоклітинний вміст Nrf2. Цей фактор транскрипції зазвичай активує експресію генів ферментів, що руйнують АФО. Nrf2 також регулює експресію ключового ферменту гліоксалазної системи GLO1, який знешкоджує метилглюксаль [113].

Окиснювальний стрес та посилене вироблення інсуліну сприяють стресу ендоплазматичного ретикулума, неправильному згортанню білка та індукції

клітинної відповіді на незгорнутий білок. Це проявляється підвищенням рівня АФО та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ); пригніченням гліколізу, синтезу білків та нуклеїнових кислот, зміною активності багатьох ензимів, що сприяє роз'єднанню процесів окиснення і фосфорилування. ПОЛ змінює структуру мембрано-зв'язаних ферментів, а також ліпідний склад мембран. У еритроцитах хворих на ЦД спостерігається підвищений вміст малонового діальдегіду та знижений вміст глутатіону та сульфгідрильних груп порівняно з еритроцитами здорових людей. Окиснювальний стрес може додатково спричиняти зміни форми еритроцитів [105; 55].

Токсичний вплив гіперглікемії на еритроцити виявляється в руйнуванні їхніх мембран, порушенні здатності гемоглобіну зв'язувати кисень та зміні механічних характеристик мембрани та клітини загалом. У еритроцитах, які інкубували в середовищі з підвищеним рівнем глюкози, виявили змінений електрофоретичний профіль мембранних білків та суттєво підвищений вміст глікозильованих білків. Еритроцити пацієнтів з діабетом 2 типу демонструють порушення у здатності вивільняти АТФ у відповідь на зниження вмісту O_2 та посилене дефосфорилування аденінових та гуанінових нуклеотидів свідчать про серйозний енергетичний дисбаланс за умов ЦД [45; 105].

У пацієнтів із ЦД спостерігалось значне зменшення плинності мембран еритроцитів. Загальновідомо, що еритроцити утворюють форму у вигляді парашута в прекапілярних артеріолах, зберігають цю форму у капілярах та відновлюють нативний вигляд у посткапілярних венулах. Деформація еритроцитів покращує кровотік в мікросудинах та великих артеріях при високій швидкості руху крові. Ряд досліджень припускає, що здатність до деформації еритроцитів знижується при ЦД. Це може призводити до порушення у транспорті кисню до тканин. Деякі дослідження виявили, що порушена здатність до деформації пов'язана з глікемічним контролем, зокрема підвищеним вмістом HbA_{1c} , високим рівнем внутрішньоклітинного сорбітолу та жорсткістю мембран еритроцитів. Така жорсткість мембрани виникає через зменшення фосфорилування та поперечного зшивання молекул спектрину, або через

дисбаланс у співвідношенні вмісту холестерину та фосфоліпідів. Завдяки порушенням у структурі мембран, еритроцити хворих на ЦД схильні до утворення агрегатів у вигляді «стовпчиків монет», що також порушує їхню кисень-транспортну функцію [20; 117].

Лейкоцити у хворих на цукровий діабет також продукують підвищену кількість АФО порівняно з нормальними клітинами завдяки активації NADPH-оксидази, опосередкованій протеїнкіназою С (PKC). PKC належить до родини білків, які модулюють діяльність інших білків за допомогою процесу фосфорилування в каскаді реакцій. Цей фермент є ключовим елементом у клітинних сигнальних шляхах за участю диацилгліцеролу (DAG), фосфатидилсерину та Ca^{2+} . Накопичення гліцеральдегід-3-фосфату внаслідок інгібування гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази за умов гіперглікемії призводить до підвищеного рівня дигідроксиацетон-3-фосфату (DHA-3-P). DHA-3-P згодом відновлюється до гліцерол-3-фосфату, який, у свою чергу, з'єднується з жирними кислотами, що сприяє синтезу диацилгліцеролу (DAG) *de novo*. Підвищений клітинний рівень DAG, який також може бути результатом гідролізу фосфатидилхоліну та фосфатидилсерину, активує PKC. Також відомо, що така стимуляція може запускатися взаємодією AGE з їхніми позаклітинними рецепторами RAGE. Відомо, що підвищена активність PKC стимулює ферменти, що генерують АФО, такі як NADPH-оксидази та ліпоксигенази, які порушують клітинний окисний баланс [60].

Нейтрофіли діють як клітини першої лінії захисту, і зниження їхньої функціональної активності сприяє високій сприйнятливості та тяжкості інфекцій за ЦД. Фагоцитоз стимулює «респіраторний вибух» у нейтрофілах в результаті активації NADPH-оксидази. Супероксидний аніон (O_2^-) є першим метаболітом, що утворюється за рахунок відновлення молекулярного кисню за допомогою цього ферменту. Утворений O_2^- дисмутується спонтанно або за допомогою супероксиддисмутази до H_2O_2 , який в свою чергу перетворюється на гіпохлорит за допомогою мієлопероксидази, що виділяється з гранул нейтрофілів [12].

NADPH-оксидаза (КФ 1.6.3.1) – це багатокомпонентний, мембрано-асоційований фермент, який каталізує одноелектронне відновлення кисню до супероксидного аніона (O_2^-), використовуючи NADPH як донор електронів. NADPH-оксидаза складається з п'ятих субодиниць: gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox та p67phox. У той час як gp91phox і p22phox присутні в плазматичній мембрані і зв'язують компоненти електронтранспортного ланцюга гем та FAD, утворюючи цитохром b558, то p40phox, p47phox та p67phox є цитозольними та беруть участь в активації ферментного комплексу. Вплив високого рівня глюкози збільшує експресію p47phox та / або опосередковане РКС фосфорилування p47phox. Є дані, що нейтрофіли хворих на цукровий діабет містять підвищений рівень дигліцеридів та підвищену активність РКС *in vivo* та *in vitro*. Локалізоване вивільнення АФО, особливо O_2^- , лейкоцитами може потенційно пошкоджувати ендотеліальні клітини, що частково пояснює розвиток мікровазулярних ускладнень ЦД [35].

NADPH також відіграє важливу роль у підтримці клітинного окиснювально-відновного балансу, який включає активність глутатіонпероксидази (GPx) та глутатіонредуктази (GRx). GRx використовує молекулу NADPH як кофактор у підтримці рівня відновленого глутатіону (GSH), ендогенного вільнорадикального антиоксиданту. Більше того, антиоксидантна активність GPx знижується зі зменшенням клітинної концентрації GSH, який є субстратом для цього ферменту. Це означає, що виснаження внутрішньоклітинного пулу NADPH внаслідок підвищеної активності альдозоредуктази у поліоловому шляху знижує рівень внутрішньоклітинного глутатіону (GSH) та GPx. Отже, це пригнічує активність системи антиоксидантного захисту клітини та сприяє окиснювальним пошкодженням біомолекул [11; 52].

Кінцеві продукти глікації (AGEs), особливо модифіковані білки, зустрічаються як у внутрішньоклітинних компартментах, так і позаклітинному матриксі. Як внутрішньоклітинні, так і позаклітинні білки модифікуються в AGEs зі зміненими функціями, коли їхні бічні радикали взаємодіють з

попередниками AGE (відновлюючими вуглеводами), такими як гліюксаль, метилгліюксаль та дезоксиглюкозон. Сформувавшись, AGEs можуть зв'язуватися з різними рецепторами до AGE (AGE-R1, AGE-R 2, AGE-R 3 і RAGE) або аномально взаємодіяти з компонентами позаклітинного матриксу, сприяючи генерації АФО та розвитку оксидативного стресу. Окрім білків, ліпиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та деякі компоненти позаклітинного матриксу можуть бути модифіковані в AGEs. Формування попередників AGEs в першу чергу спричиняється гіперглікемією. Наприклад, накопичення глюкози внаслідок гіперглікемії може призвести до її самоокиснення, що призводить до утворення гліюксалю. Подібно до цього, неферментативне дефосфорилування тріозо-фосфатів (гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетон-3-фосфат) призводить до утворення метилгліюксалю. Третій попередник AGEs, відомий як 3-дезоксиглюкозон, утворюється в результаті розщеплення глюкозо-1-аміно-1-дезоксифруктозо-лізинового аддукту, який зазвичай називають продуктом Амадорі. Зв'язування AGEs із рецептором сприяє розвитку оксидативного стресу завдяки активації РКС [112; 121; 27].

Підсумовуючи, варто зазначити, що надмірна неконтрольована продукція АФО та розвиток оксидативного стресу, зокрема у клітинах крові, є ключовим фактором виникнення багатьох ускладнень ЦД та патогенезу цього захворювання.

1.1.2. Молекулярні механізми транспорту глюкози в клітини та його особливості за ЦД

Здатність засвоювати та метаболізувати глюкозу на клітинному рівні – властивість, яка є спільною для переважної більшості існуючих організмів. Більшість клітин ссавців імпортують глюкозу шляхом полегшеної дифузії, яка опосередкована членами родини мембранних транспортних білків GLUT (SLC2A). Чотирнадцять типів GLUT утворюються в організмі людини, до яких належать також транспортери інших субстратів, відмінних від глюкози, включаючи фруктозу, міоїнозитол та сечову кислоту. Первинні фізіологічні

субстрати принаймні для половини з цих 14 білків GLUT є або не до кінця визначеними, або взагалі невідомими. Добре дослідженими є ізоформи GLUT 1–4, для яких визначені чіткі регуляторні та/або кінетичні властивості, що відображають їхню специфічну роль у гомеостазі глюкози в клітині та в цілому організмі.

Намагаючись пояснити ізомерну специфічність та інтенсивність поглинання глюкози еритроцитами людини Лефевре у 1948 р. першим висунув постулат про необхідність певного компонента в клітинній плазматичній мембрані для перенесення глюкози через ліпідний бішар. Однак, лише в 1970-х роках було доведено, що транспорт глюкози опосередковується білком, вбудованим у плазматичну мембрану еритроцитів. Клонування кДНК, що кодує еритроцитарний транспортер глюкози (GLUT1), відбулося в 1985 р., а згодом у людини було виявлено ще 13 споріднених членів родини білків SLC2A (GLUT).

Родина білків GLUT належить до головної надродини фасилітаторів (MSF – Major Facilitator Superfamily) і, за консенсусом, називаються GLUT (від англійської аббревіатури «Транспортери глюкози»). Наразі визначено понад 5000 членів MFS. Більшість білків GLUT каталізують полегшений (енергонезалежний) двонаправлений транспорт їхніх субстратів через мембрани, і вони можуть проявляти симетричну або асиметричну транспортну кінетику. GLUT – це білки, які складаються з близько 500 амінокислотних залишків та містять 12 трансмембранних альфа-спіралей і один N-з'єднаний олігосахарид [120].

Теперішні знання про гомеостаз глюкози в організмі за нормального стану – і особливо за різних метаболічних порушень – безпосередньо пов'язані з розумінням фізіології GLUT. GLUT1 унікальний своєю здатністю транспортувати глюкозу через гематоенцефалічний бар'єр; транслокація GLUT4 до плазматичної мембрани у відповідь на інсулін регулює швидкість в контрольованому інсуліном процесі поглинання глюкози скелетними м'язами, а також жировою тканиною; GLUT2 слугує сенсором глюкози у β -клітинах

підшлункової залози, тим самим безпосередньо беручи участь у сигнальному каскаді глюкозо-індукованої секреції інсуліну [19].

Інсулін регулює енергетичний обмін, ініціюючи кілька сигнальних каскадів, які контролюють ріст та виживання клітин, а також поглинання білків, глікогену та ліпідів, і навіть їхній синтез та гідроліз. Деякі з цих шляхів, включаючи RAS-позаклітинної сигнал-регульованої кінази ERK та комплекс мішені рапаміцину ссавців mTORC1, не надто важливі для контролю транспорту глюкози. Натомість найбільш необхідними є сигнальний каскад фосфатидилінозитл-3-кінази (PI3K) та APS (білка-адаптера з гомологією плекстрину (PH) та Src2 (SH2); також відомий як SH2B2). Разом ці шляхи забезпечують ефективну доставку GLUT4 до клітинної поверхні шляхом ежнад формування сигнальних платформ на плазматичній мембрані, які складаються з ліпідів, протеїнкіназ, ліпідних кіназ, малих ГТФаз та білків-адаптерів.

Доставка GLUT4 до клітинної поверхні вимагає його мобілізації з внутрішньоклітинних мембранних компартментів, розпізнавання везикул, що містять GLUT4, на плазматичній мембрані і, нарешті, злиття цих двох мембран. Інсулінове сигналювання координує ці етапи, залучаючи низку невеликих ГТФаз, які циклічно перетворюються між «активною» ГТФ-зв'язаною конформацією, в якій вони опосередковують свою біологічну функцію та «неактивною» ГДФ-зв'язаною. Інсулін змінює стан активації малих ГТФаз, регулюючи фактори обміну гуанілових нуклеотидів (GEF) та активуючі ГТФази білки (GAP), обидва з яких контролюють циклічність станів ГТФ-аз. На додаток до малих ГТФаз, сигнал інсуліну безпосередньо націлений на рухові, мембрано-зв'язані, та білки, що регулюють злиття мембран. Це дозволяє припустити, що інсулін діє на декількох етапах «маршруту» GLUT4 в клітині для збільшення концентрації цього транспортера на поверхні клітини [82].

Сигнальні шляхи інсуліну ініціюються зв'язуванням інсуліну зі своїм трансмембранним рецептором, що складається з α та β ланцюгів та володіє тирозинкіназною активністю. Зв'язування ендогенних лігандів (інсуліну або інсуліноподібного фактору росту I та II) з α -ланцюгом інсулінового рецептора

викликає структурні зміни в β -ланцюзі, що запускають аутофосфорилування в залишках тирозину з наступним залученням адаптерних білків, субстратів рецепторів інсуліну (IRS), SHC-трансформуючого білка, а також адаптерного білка з доменом PH і SH2 (білок APS). Цей процес створює відповідний сайт для зв'язування IRS-1, який потім активується за допомогою фосфорилування різними інсулін-індукованими кіназами, такими як PKC, SIK2, AKT, S6K1, mTOR, позаклітинною сигнал-регульованою кіназою 1/2 (ERK1/2) і ROCK1.

Активований IRS-1 запускає подальшу передачу сигналу, зв'язуючись з P13K та активуючи її, що, в свою чергу, каталізує перетворення фосфатидилінозитол 4,5-дисфосфату (PIP2) у фосфатидилінозитол 3,4,5-трисфосфат (PIP3). PIP3 є потужним індуктором активації різних протеїнкіназ, переважно протеїнкінази В (PKB, також відома як Akt). PKB сприяє надходженню глюкози в клітини шляхом транслокації GLUT4, а також інгібує кіназу глікогенсинтази, яка є інгібітором глікогенсинтази, сприяючи тим самим синтезу глікогену [133].

Гіперглікемія у хворих на ЦД 2 типу пов'язана з резистентністю до інсуліну та дефектами поглинання глюкози. SLC2A4 (GLUT4) переважно експресується в жировій тканині, скелетних та серцевих м'язах. У більшості пацієнтів з ЦД 2 типу спостерігається низький рівень експресії GLUT4 в жировій тканині, і його функція порушується в скелетних м'язах. Нестача GLUT4 в адипоцитах та скелетних м'язах миші погіршує засвоєння глюкози цими тканинами. Однак ліпогенез *de novo*, а також секреція ЛПДВЩ (ліпопротеїнів дуже високої щільності) та триацилгліцеролів підвищуються внаслідок посиленого поглинання глюкози в печінці, про що свідчить підвищення активності печінкової глюкокінази та ключового ферменту ліпогенезу АСС (ацетил-КоА карбоксилази). Таким чином, дисфункція GLUT4 в жировій тканині та скелетних м'язах може сприяти поглинанню глюкози та синтезу ліпідів у печінці, а печінкова ліпідна секреція пропонує іншу енергетичну форму для покриття нестачі глюкози [33].

Вільні радикали постійно продукуються в процесі нормального метаболізму та відіграють важливу роль у клітинній передачі сигналів. Однак, коли відбувається їхня надпродукція, розвивається оксидативний стрес. Оксидативний стрес може впливати на транспорт глюкози шляхом активізації розвитку інсулінової резистентності, погіршуючи передачу сигналу інсуліну та спричиняючи порушення регуляції адипокінів. Такі біомаркери окиснювального ураження, як малоновий діальдегід, карбонільні групи білків, 4-гідрокси-2-ноненаль, гідропероксиди, кінцеві продукти оксидації білків (AOPPs), 3-нітротирозин, кінцеві продукти глікозилювання білків (AGEs), вуглеводні метаболіти та 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OH-dG) можуть потенційно знизити чутливість тканин до інсуліну.

Оксидативний стрес активує кілька серин-треонінкіназних сигнальних шляхів, зокрема IKK β /NF- κ B та JNK, які, в свою чергу, фосфорилують білки IRS, що призводить до їхньої деградації. Надлишок АФО також інгібує локалізацію GLUT4 в клітинних мембранах, порушуючи інсулінове сигналювання. Інші можливі зв'язки між оксидативним стресом та резистентністю до інсуліну включають зменшення індукованого інсуліном переміщення IRS-1 та PI3K між цитоплазмою та мікросомами, пригнічення фосфорилування PKB, фосфорилування серину 307 у IRS-1 та зниження експресії GLUT4 [133].

Транспорт глюкози через плазматичну мембрану є важливим процесом, який забезпечує нормальне функціонування клітини, особливості якого, однак, для лейкоцитів периферичної крові хворих на ЦД невідомі, а інформація про типи транспортерів глюкози в цих клітинах є мізерною і суперечливою. Ряд досліджень показали, що GLUT1 і GLUT3 присутні як білки-транспортери глюкози в лімфоцитах. Патологічні зміни концентрації глюкози в сироватці крові впливають на експресію гена SLC2A, поглинання глюкози та її метаболізм в лімфоцитах. У гранулоцитах за ЦД виявили зростання рівня експонування GLUT4 та GLUT3, але зниження GLUT1. З іншого боку, для більшості популяцій лімфоцитів виявили відсутність цих транспортерів.

Наразі відомо, що у лейкоцитах периферичної крові наявні такі транспортери глюкози: GLUT1, GLUT3, GLUT6, GLUT9. Відомо, що GLUT6 є низькоафінним транспортером глюкози із наразі неідентифікованим первинним фізіологічним субстратом і його функція у лейкоцитах нараз невідома (хоча припускають, що він може бути залучений в транспорті глюкози між внутрішніми компартментами клітини), а щодо GLUT9 існують дані про його наявність у лейкоцитах, однак його функцію у цих клітинах досі не з'ясовано. Таким чином, GLUT1 та GLUT3 вважаються основними транспортерами глюкози у лейкоцитах [125; 98].

Підвищена сприйнятливність до інфекцій є добре відомим ускладненням погано контрольованого діабетичного стану. У хворих на ЦД інфекції протікають важче, ускладнення виникають частіше. Наявні публікації стосуються змінених властивостей лейкоцитів, їх хемотаксису, адгезії та фагоцитозу, які є ключовими елементами імунної відповіді. Тим не менше, даних у цій галузі досліджень недостатньо і вони стосуються переважно поліморфно-ядерних лейкоцитів. У дослідженнях на тваринах є деякі відомості про функціонування лімфоцитів. Наприклад, у щурів з індукованих алоксаном ЦД та щурів із ожирінням спостерігається знижена мітогенна реакція лімфоцитів.

Було показано, що у моноцитах пацієнтів з ЦД поглинання 2-дезоксиглюкози зростало у відповідь на інсулін *in vitro*, що свідчить про те, що моноцити здатні специфічно зв'язувати цей гормон. ЦД також спричиняє важливі зміни у метаболізмі лімфоцитів, зокрема відомо, що у лімфоцитах пацієнтів з ЦД 2 типу активність піруватдегідрогенази нижча порівняно зі здоровими людьми [98].

Глюкоза є найважливішим джерелом енергії для клітин із швидким метаболізмом. Це стосується лейкоцитів, які повинні швидко реагувати у відповідь на патогени. Нормальний транспорт глюкози, на думку багатьох дослідників відіграє ключову роль у цьому процесі.

1.2. Біологічні ефекти фотобіомодуляційної терапії

У 1967 році, через кілька років після винайдення першого робочого лазера, Е. Местер в університеті Земмельвейс у Будапешті (Угорщина) вирішив перевірити, чи може лазерне випромінювання викликати рак у мишей. Він поголив їм шерсть на спині, розділив тварин на дві групи і в одній з груп провів лазерну обробку шкіри рубіновим лазером з низькою потужністю ($\lambda=694$ нм). У мишей рак не розвинувся і, на його здивування, шерсть у тварин з опроміненої групи відростала помітно швидше, ніж у неопромінених. Це була перша демонстрація «лазерної біостимуляції». Відтоді медикаментозне лікування джерелами когерентного (лазери) або некогерентного світла (світлодіоди) пройшло кілька етапів розвитку. Наразі низькоінтенсивна лазерна (або світлова) терапія (low-level laser (light) therapy, LLLT), також відома як «холодний лазер», «м'який лазер», «біостимуляція» або «фотобіомодуляційна терапія» (ФБМТ) практикується як частина фізичної терапії в багатьох частинах світу. Світлова терапія є одним з найдавніших терапевтичних методів, що використовуються людьми (історично як сонячна терапія у єгиптян, пізніше як ультрафіолетова терапія, за яку Нільс Фінсен отримав Нобелівську премію в 1904 році «на знак визнання його заслуг у справі лікування хвороб — особливо вовчаку — з допомогою концентрованого світлового випромінювання, що відкрило перед медичною наукою нові широкі горизонти») [89; 107]. Використання лазерів і світлодіодів як джерел світла стало наступним кроком технологічного розвитку світлотерапії, яка зараз застосовується у всьому світі. Для ФБМТ питання полягає вже не в тому, чи має світло біологічні ефекти, а як енергія від лазера або світлодіода працює на рівні клітини та організму, і які оптимальні параметри світла для використання цих різних джерел світла.

Хоча ФБМТ тепер використовується для лікування широкого спектру захворювань, вона залишається спірною з двох принципових причин: по-перше, її базові біохімічні механізми залишаються погано зрозумілими, тому її використання багато в чому емпіричне. По-друге, велика кількість таких параметрів як довжина хвилі, потік, потужність, структура імпульсу має бути

вивчена для кожного типу лікування. Неоптимальний вибір параметрів може призвести до зниження ефективності лікування або навіть до негативного терапевтичного результату. Як результат, багато опублікованих досліджень ФБМТ повідомляють про негативні ефекти просто через неправильний вибір джерела світла і дозування. Фактично ФБМТ характеризується двофазною дозовою відповіддю: більш низькі дози світла часто більш сприятливі, ніж високі дози [36].

Перший закон фотобіології постулює, що для того, щоб видиме світло малої потужності мало вплив на живу біологічну систему, фотони повинні поглинатися електронними смугами поглинання, які належать деяким молекулярним хромофорам або фотоакцепторам. Одним з підходів до пошуку таких хромофорів є аналіз спектрів дії. Це має бути графік, що представляє біологічну відповідь на світло як функцію довжини хвилі, частоти або енергії фотонів і який повинен бути схожим на спектр поглинання молекули фотоакцептора. Факт того, що такий графік може бути побудований підтримує гіпотезу про існування клітинних фотоакцепторів і сигнальних шляхів, стимульованих світлом. Найпростіший приклад – спектри поглинання хлорофілу і ефективність фотосинтезу:

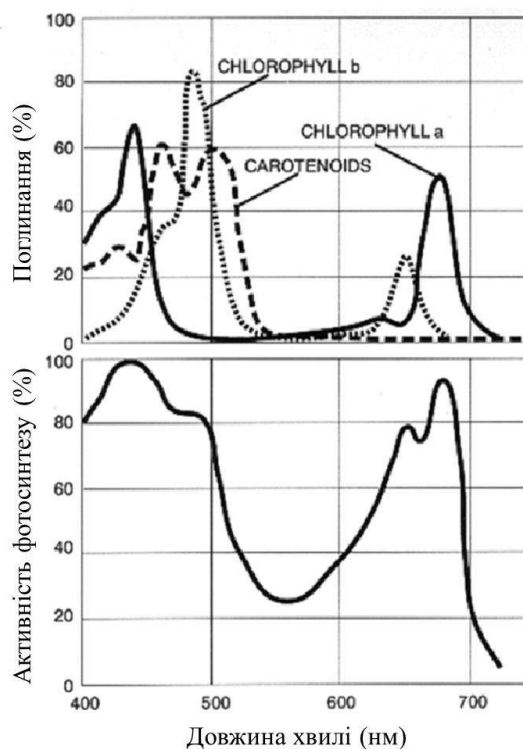


Рис. 2. Спектри поглинання хлорофілу і ефективність фотосинтезу [127].

Другий важливий фактор включає оптичні властивості тканини. І поглинання, і розсіювання світла в тканинах залежать від довжини хвилі (обидва вони набагато вищі в синій ділянці спектру). Основні тканинні хромофори (гемоглобін і меланін) мають високі смуги поглинання на довжинах хвиль, коротших за 600 нм, в той час як вода починає сильно поглинати світло при довжинах хвиль більше 1150 нм. З цих причин існує так зване «оптичне вікно» в тканинах, що покриває червону і ближню інфрачервону ділянку довжин хвиль, де ефективне проникнення світла у тканини є максимальним [53].

Ще у 1989 р. було запропоновано, що механізм ФБМТ на клітинному рівні базується на поглинанні монохроматичного видимого і близько-інфрачервоного випромінювання компонентами клітинного дихального ланцюга [12]. Внутрішня мітохондріальна мембрана містить 5 комплексів інтегральних мембранних білків: NADH дегідрогеназу (комплекс I), сукцинатдегідрогеназу (комплекс II), цитохромредуктазу (комплекс III), цитохром-оксидазу (комплекс IV), АТФ-синтазу (комплекс V) і дві вільно дифундуючі молекули убіхінону і цитохрому с, які переносять електрони від одного комплексу до наступного. Дихальний ланцюг здійснює поетапну передачу електронів з NADH і FADH₂ (утворені в циклі Кребса) до молекул кисню для формування (за допомогою протонів) молекул води. Енергія, що виділяється цим перенесенням, використовується для перекачування протонів (H⁺) з матриксу мітохондрій до міжмембранного простору. Протони можуть протікати назад по градієнту, який формується таким активним транспортом, до матриксу через інший комплекс інтегральних білків у внутрішній мембрані, комплекс АТФ-синтази [69].

Було отримано спектри поглинання для цитохром с оксидази за різних станів окиснення. Виявлено, що ці спектри є дуже подібними до спектрів дії біологічної реакції на світло. Тому було запропоновано, що саме цитохром с оксидаза (КФ 1.9.3.1) є первинним фотоакцептором для червоного та ближньо-інфрачервоного діапазону в клітинах ссавців. Цитохром с оксидаза містить два залізовмісні центри, haem a і haem a₃ (так звані цитохроми a та a₃), та два

купрумвмісних центри, CuA і CuB. Повністю окиснена цитохром с оксидаза має залізовмісні центри із Fe (III), а два купрумвмісні центри із Cu (II), тоді як повністю відновлена цитохром с оксидаза має залізо Fe (II) і Купрум в Cu (I). Існує багато проміжних змішаних валентних форм ферменту, до яких також можуть бути приєднані координатні ліганди, такі як CO, CN і форміат. Всі ці окремі стани окиснення ферменту мають різні спектри поглинання, що, ймовірно, пояснює незначні відмінності в спектрах дії ФБМТ. Для цитохром с оксидази загалом було отримано 4 піки поглинання 1) 613,5 - 623,5 нм, 2) 667,5 - 683,7 нм, 3) 750,7 - 772,3 нм, 4) 812,5 - 846,0 нм. Ці піки збігаються із спектрами дії біологічної відповіді ФБМТ [31; 71].

Поглинання фотонів молекулами призводить до виникнення електронно-збуджених станів і тому може призвести до прискорення реакцій перенесення електронів. Активніший транспорт електронів, в свою чергу, призводить до збільшення синтезу АТФ. Таке індуковане світлом збільшення синтезу АТФ і збільшення протонного градієнта призводить до підвищення активності Na^+/H^+ і $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ антипортерів і всіх АТФ-залежних іонних переносників, зокрема Na^+/K^+ АТФази і Ca^{2+} помп. АТФ є субстратом для аденілатциклази, і тому рівень АТФ контролює рівень цАМФ. Ca^{2+} і цАМФ є дуже важливими вторинними месенджерами, зокрема Ca^{2+} регулює майже кожен процес в організмі людини (скорочення м'язів, згортання крові, передача сигналу в нервах, експресія генів, тощо) [53].

Крім опосередкованого цитохром с оксидазою збільшення синтезу АТФ, можуть існувати й інші механізми, що пояснюють дію ФБМТ. Одним з них є так звана «синглет-киснева гіпотеза». Деякі молекули із спектром поглинання у видимій ділянці, такі як порфірини, які не мають координаційних центрів з металами і деякі флавопротеїни можуть переходити у довготривалий триплетний стан після поглинання фотона. Молекули у такому стані можуть взаємодіяти з киснем з передачею енергії, що призводить до утворення синглетного кисню. Ці ж молекули використовуються у фотодинамічній терапії (ФДТ) для знищення ракових клітин або деструкції кровоносних судин. Дослідники ФДТ давно

виявили, що дуже низькі дози опромінення за ФДТ можуть викликати проліферацію, а не знищення малігнізованих клітин [48; 100].

Наступним запропонованим механізмом була «гіпотеза зміни окисно-відновних властивостей». Зміна мітохондріального метаболізму і активація дихального ланцюга шляхом опромінення, окрім підвищення рівня АТФ, також збільшувало б продукцію супероксид аніонів $O_2^{\cdot-}$. Відомо, що загальна клітинна продукція $O_2^{\cdot-}$ залежить насамперед від метаболічного стану мітохондрій. Збільшення дози опромінення (за відсутності будь-яких інших подразників) спочатку призводить до збільшення вмісту АФО. Однак продукція АФО при опроміненні не є односпрямованим явищем, оскільки спостерігається конкуруючий процес фотостимульованої деактивації утворених АФО. Різні дослідження показали, що за опромінення світлом видимої ділянки спектра спостерігалось підвищення активності каталази, супероксиддисмутази, а також підвищувався вміст радикалів аскорбінової кислоти, тобто клітини збільшували свою здатність елімінувати надлишок АФО [86]. Інші окисно-відновні шляхи в клітинах також можуть бути активовані ФБМТ. Зокрема може активуватися NADPH-оксидаза – фермент, що виявлений у активованих нейтрофілах і здатний до немітохондріального респіраторного вибуху і продукції великої кількості АФО. Виявлено, що опромінення червоним світлом здатне активувати рецепторні тирозинкінази, фосфоліпазу C та протеїнкіназу C, що в свою чергу запускають збирання комплексу NADPH-оксидази. Окрім того, є дані, що завдяки наявності хромофорів напівхінонової форми, NADPH-оксидаза здатна поглинати світло з $\lambda = 632,8$ нм і таким чином активуватися [44].

Активність цитохром с оксидази може інгібуватися оксидом азоту (NO). Таке пригнічення дихання за участі NO можна пояснити прямою конкуренцією між NO і O_2 за відновлений центр CuВ/a3 цитохром с оксидази. Відомо, що лазерне опромінення може відновлювати активність цитохром с оксидази, що була інгібована NO і таким чином може збільшити активність клітинного дихання («гіпотеза NO») [16].

Точний спосіб впливу світла на цитохром с оксидазу ще не відомий. Наявність даних про те, що NO вивільняється клітинами під час ФБМТ дозволяє припустити, що цитохром с оксидаза і вивільнення NO пов'язані між собою двома можливими шляхами. Можливо, що ФБМТ може викликати фотодисоціацію NO та цитохром с оксидази. Дисоціація NO від ССО, під час ФБМТ запобігає пригніченню клітинного дихання і призводить до збільшення продукції АТФ [70].

У клітині наявні так звані редокс-пари, що включають зокрема: нікотинамідаденіндинуклеотид (окислена/відновлена форми) NAD/NADH, нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат NADP/NADPH, глутатіон/глутатіондисульфідні пари GSH/GSSG і тіоредоксин/тіоредоксиндисульфідні пари Trx(SH)₂/TrxSS. Зміни окисно-відновного стану клітини викликають активацію численних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема регулюють синтез нуклеїнових кислот, білків, активацію ферментів і прогресування клітинного циклу. Ці цитозольні відповіді, у свою чергу, індукують різноманітні транскрипційні зміни. Кілька факторів транскрипції регулюються змінами в клітинному окисно-відновному стані. Серед них редокс фактор-1 (Ref-1)-залежний білок активатор-1 (AP-1) (Fos та Jun), ядерний фактор κB (NF-κB), p53, (ATF/CREB) та гіпоксія-індукований фактор (HIF)-1α. Як правило, окиснена форма редокс-залежних факторів транскрипції має низьку ДНК-зв'язуючу активність. Ref-1 є важливим фактором для специфічного відновлення цих факторів транскрипції.

Запропоновано, що ФБМТ стимулює зрушення в загальному окисно-відновному потенціалі клітин у напрямку більшого окиснення. Різні клітини за різних умов мають різні окисно-відновні стани. Отже, вплив ФБМТ на такі клітини може істотно відрізнятись. Клітини із порушеним окисно-відновним балансом мають високий потенціал для реагування на ФБМТ, тоді як клітини з оптимальним окисно-відновним станом реагують слабо або не реагують взагалі [36].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Умови проведення досліджень

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Wistar масою 120–180 г, яких утримували в стандартних умовах віварію із вільним доступом до корму та води. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з положенням про «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах», ухваленим Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Експериментальний ЦД (ЕЦД) індукували внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину («Sigma», США), розведеного у 10 mM Na-цитратному буфері (pH 4,5) у розрахунку 6 мг стрептозотоцину на 100 г маси тварин. Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл цитратного буферу. Розвиток діабету контролювали за концентрацією глюкози натще у крові через 72 години після ін'єкції. У експериментах використовували щурів із концентрацією глюкози у крові більше ніж 12 ммоль/л.

Тварини були поділені на 4 групи: 1 – контрольні тварини; 2 – контрольні тварини, яких опромінювали; 3 – тварини з ЕЦД; 4 – тварини з ЕЦД, яких опромінювали. Щурів піддавали дії ФБМТ протягом 5 хв щодня упродовж 10 днів. Як джерело світла використовували матрицю із 30 надяскравих світлодіодів із загальною потужністю 150 мВт з довжиною хвилі 630-660 нм, яка є аналогом фотонних матриць «Барва-Флекс/ФМ» («Лазер та Здоров'я», Україна). Після 10 днів опромінення здійснювали забір крові шляхом декапітації тварин під ефірним наркозом.

2.2. Характеристика об'єкту досліджень

Об'єктом дослідження слугували цільна кров, еритроцити та лейкоцити периферичної крові та плазма крові у нормі, за умов ЕЦД та дії ФБМТ. Для запобігання згортання, кров збирали у пробірки з додаванням гепарину (кінцеве

розведення гепарин : цільна кров = 1:100). Порцію крові (2 мл) центрифугували 15 хв при 3000 об/хв для отримання плазми, яку зберігали при -20 °С для подальших досліджень. Решту крові використовували для інших досліджень на цільній крові, для виділення еритроцитів та лейкоцитів.

2.3. Вимірювання концентрації глюкози

Концентрацію глюкози у цільній крові визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору “Філісітдіагностика” (Україна) згідно з інструкцією фірми виробника.

Принцип методу базується на реакції окиснення глюкози до глюконової кислоти з утворенням пероксиду водню (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 дослідження до 90 мкл стабілізуючого розчину (1,34% розчин щавлевокислого натрію у 0,85% NaCl) вносили 10 мкл цільної крові, взятої з хвостової вени щура за допомогою мікрокапіляра. Проби центрифугували для осадження еритроцитів при 3000 об/хв впродовж 5 хв. Для приготування дослідної проби відбирали 20 мкл супернатанту та додавали 100 мкл розчину ензимів та 100 мкл буферного розчину. Для приготування калібрувальної проби замість зразка додавали 20 мкл калібрувального розчину глюкози з концентрацією 1 ммоль/л. Для приготування холостої проби, замість зразка додавали 20 мкл фізіологічного розчину. Через 20 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 540 нм. Розрахунок концентрації глюкози (в ммоль/л) здійснювали за формулою:

$$C = \frac{E_d - E_x}{E_k - E_x} \times 10$$

де E_d , E_k і E_x – оптичні густини дослідної, калібрувальної та холостої проб відповідно; 10 – коефіцієнт розведення зразків.

2.4. Глюкозонавантажувальний тест

Оральний глюкозонавантажувальний тест виконували вранці на 10 день експерименту після 12-годинного голодування тварин. Для цього щурам перорально за допомогою зонда вводили розчин глюкози із розрахунком 1 г глюкози на 1 кг маси тварин. Концентрацію глюкози вимірювали перед введенням (0 хв) та через 30, 60, 90 та 120 хв після введення. Рівень толерантності організму до навантаження глюкозою визначали за площею під глікемічною кривою, використовуючи правило трапецоїда [109].

2.5. Виділення лейкоцитів

Лейкоцити виділяли методом центрифугування крові у градієнті фіколу-тріомбразу ($\rho = 1,076-1,078$) [28]. Виділені клітини двічі промивали фосфатним забуференим розчином (PBS: (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄ × 7H₂O, 1.8 мМ KH₂PO₄, рН 7.4) і негайно використовували в експериментах або миттєво заморожували рідким азотом і зберігали при -20 °С.

Для досліджень використовували або живі клітини, або лізати лейкоцитів. Клітини (2×10^6) лізували за допомогою 25 мМ Tris-HCl буферу (рН 7.5), що містив 0,5 % Triton X-100, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ EDTA та коктейль інгібіторів протеаз («Carl Roth GmbH+Co. KG», Німеччина, Art. No. 3751.1). Лізати центрифугували протягом 15 хв при 8000 об/хв, отриманий супернатант використовували у експерименті.

2.6. Визначення кількості еритроцитів

Кількість еритроцитів визначали шляхом підрахунку клітин в камері Горяєва [8]. Для цього у пробірку додають 4 мл рідини для розведення (0,85% розчин NaCl, підфарбований метиленовим синім для підфарбовування ядер лейкоцитів та легшої диференціації клітин) та 20 мкл цільної крові. Отримане співвідношення 1:201 приймають як 1:200. Суміш ретельно перемішують і заповнюють нею камеру. Після заповнення камеру залишають на 1-2 хв у спокої для осадження формених елементів крові та підраховують кількість клітин.

Еритроцити рахують у 5 великих (80 малих) квадратах, які розміщені по діагоналі. Кількість еритроцитів в 1 мкл крові обчислюють за формулою:

$$E = \frac{a \times 4000 \times b}{A}$$

де E – кількість еритроцитів в 1 мкл крові; a – кількість еритроцитів, що були підраховані у певній кількості малих квадратів; 4000 – оскільки об'єм малого квадрата дорівнює $1/4000 \text{ мм}^3$, то щоб перейти до об'єму 1 мкл (1 мм^3), множимо на 4000; b – ступінь розведення крові (200); A – кількість малих квадратів, у яких рахували еритроцити (80).

2.7. Визначення кількості лейкоцитів

Кількість лейкоцитів визначали шляхом підрахунку клітин в камері Горяєва [8]. Для цього у пробірку додають 400 мкл рідини для розведення (3-5% розчин оцтової кислоти, підфарбований метиленовим синім) та 20 мкл крові. Отримане співвідношення 1:21 приймають як 1:20. Суміш ретельно перемішують і заповнюють нею камеру. Лейкоцити рахують у 100 великих (1600 малих) квадратах. Кількість лейкоцитів в 1 мкл обчислюють за формулою:

$$L = \frac{a \times 4000 \times b}{A}$$

де L – кількість лейкоцитів в 1 мкл крові; a – кількість лейкоцитів, що були підраховані у певній кількості малих квадратів; 4000 – оскільки об'єм малого квадрата дорівнює $1/4000 \text{ мм}^3$, то щоб перейти до об'єму 1 мкл (1 мм^3), множимо на 4000; b – ступінь розведення крові (20); A – кількість малих квадратів, у яких рахували лейкоцити (1600).

2.8. Морфологічні дослідження формених елементів крові

2.8.1. Приготування мазків крові

Близько 10-15 мкл свіжовідібраної крові наносять краплею на чисте предметне скло. Мазок роблять шліфованим склом, поставивши його під кутом 45° до предметного скла. Отримані мазки висушують на повітрі, після чого фіксують в абсолютному метиловому спирті (3-5 хв). Висушені і зафіксовані

мазки фарбують за Романовським-Гимзою. Фарба має такий склад: азур II – 3 г, водорозчинний жовтий еозин – 0,8 г, метанол – 250 мл, гліцерин – 250 мл. Робочий розчин фарби готують з розрахунку 1-2 краплі готової фарби на 1 мл дистильованої води. Фарбу наливають на мазок якомога вищим шаром, забарвлюють протягом 30-35 хв. Потім мазки промивають водою і висушують на повітрі. За допомогою мікроскопа підраховували лейкоцитарну формулу цільної крові [8].

2.8.2. Визначення кількості ретикулоцитів

Принцип методу полягає, що зернисто-сітчасто-нитчасту субстанцію молодих еритроцитів видно лише у випадку прижиттєвого (суправітального) фарбування, тобто без висушування і фіксації. Для цього використовували фарбування у пробірках за методикою Л. Гейльмейєра у модифікації Н.О. Сибірної. 0,08 мл 1% розчину блискучого крезилового синього (brilliant cresyl blue) на ізотонічному розчині NaCl набирають у пробірку. До барвника додають 20 мкл цільної крові, старанно перемішують і пробірку закривають. Через 60 хв готують мазки цієї суміші на предметному склі. Після висихання мазок фіксують етанолом (5-10 хв) і дофарбовують за Романовським-Гимзою.

Ретикулоцити підраховують на 1000 еритроцитів, результати виражають у відсотках [8].

2.9. Визначення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика

Цільну кров щура змішують з 0,85% розчином NaCl до отримання екстинкції 0,700 при довжині хвилі 630 нм. Такий розчин є робочим, його можна використовувати протягом 3-4 год (при кімнатній температурі). Дослід проводять у термостатованій кюветі при 24 °С.

У кювету вносять 1,5 мл робочої суспензії еритроцитів і додають такий же об'єм 0,004 Н розчину HCl у 0,85 % NaCl. Точно через 30 с роблять перше визначення екстинкції при $\lambda = 630$ нм. Потім кожні 30 с протягом 7 хв визначають

екстинкцію, поки її значення не перестане змінюватися. У контрольну кювету додають 1,5 мл H_2O і 1,5 мл 0,004 н розчину HCl у 0,85 % NaCl .

Оскільки при 630 нм майже не вловлюється зміна кольору гемоглобіну, екстинкція залежить лише від концентрації завислих у розчині клітин. Постійне зменшення екстинкції, яке спостерігаємо через 30-секундні інтервали, викликане поступовим руйнуванням еритроцитів, причому руйнуються спочатку ті клітини, резистентність яких до HCl слабша.

Під час спектрофотометричної реєстрації кінетики гемолізу з отриманого ряду екстинкцій можна обчислити процентний розподіл еритроцитів за групами стійкості. Обрахунки проводять за формулою:

$$X = \frac{\Delta E \times 100\%}{\Delta E_{\text{заг.}}}$$

де X – гемоліз еритроцитів, %; ΔE – різниця між значеннями екстинкції з інтервалом у 30 с; $\Delta E_{\text{заг.}}$ – різниця між першим і останнім значеннями екстинкції.

Процентний розподіл еритроцитів за стійкістю зручно зображати кривою залежності відсотку гемолізу еритроцитів від часу гемолізу. Ця крива називається еритрограмою [8].

2.10. Визначення вмісту гемоглобіну

Загальний вміст гемоглобіну визначали ціанметгемоглобіновим фотометричним методом. Його принцип полягає у тому, що кров змішують з реактивом, який перетворює гемоглобін у ціанметгемоглобін, концентрацію якого вимірюють спектрофотометрично.

До 20 мкл крові додають 5 мл трансформувального розчину такого складу: 0,1% NaHCO_3 , 0,05% ацетоціангідрин, 0,02% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Екстинкцію вимірюють через 20 хв, які потрібні для повного перетворення гемоглобіну в ціанметгемоглобін, при довжині хвилі 540 нм і товщині шару досліджуваної речовини 1 см, порівнюючи з водою. Отриманий показник оптичної густини множать на коефіцієнт 36,77, отримуючи вміст гемоглобіну у грам-процентах

(г%). Якщо показник у г% помножити на 10, отримують значення вмісту гемоглобіну у г/л [8].

2.11. Визначення вмісту протопорфірину

До 0,2 мл дистильованої води додавали 0,05 мл цільної крові. Після ретельного перемішування відбирали 0,05 мл отриманого гемолізату та додавали 1 мл суміші етилацетат-льодяна оцтова кислота (4:1 за об'ємом), ретельно перемішували і центрифугували протягом 3 хв при 3000 об/хв. Отриманий супернатант відбирали та додавали до нього 1 мл 1,5 М НСІ. Суміш перемішували та центрифугували протягом 1 хв при 3000 об/хв. Отримували дві рідкі фази: етилацетатну (коричневого кольору) та НСІ-ну (прозора). Використовуючи спектрофлюориметр Shimadzu RF-6000, вимірювали спектри флюоресценції прозорої фази при довжинах хвиль збудження 408 нм та емісії 645-680 нм. За допомогою програмного забезпечення LabSolutions RF ver. 1.15 вимірювали площу під піком при довжині хвилі 662 нм. Вміст протопорфірину виражали в АУ на 1 мкл крові [110].

2.12. Визначення спорідненості гемоглобіну до кисню

Спорідненість гемоглобіну до кисню вивчали спектрофотометричним методом у модифікації Іванова шляхом побудови кривих оксигенації [25, 62].

Гемоліз еритроцитів проводили 3,3 мМ К⁺/Na⁺-фосфатним буфером (рН 7,36). Дослід проводили з розчином гемоглобіну, оптична густина якого до дезоксигенації складала 0,400–0,500 при довжині хвилі 560 нм, що відповідає концентрації $4,5 - 5,0 \times 10^{-5}$ М.

Для аналізу використовували прилад (сатуратор), який складається з тонометра і системи дозування й обміну газових складових.

Кювету заповнювали 4 мл розчину гемоглобіну. Для уникнення бурхливого спінювання розчину при відкачуванні повітря кювету поміщали в охолоджену воду. Для кращої дезоксигенації кювету поступово нагрівали у воді до 37°C.

Ступінь перетворення гемоглобіну в дезоксиформу контролювали спектрофотометрично, використовуючи орієнтовний критерій повної дезоксигенації гемоглобіну: $D_{555}/D_{540} \geq 1,24$, де D – оптична густина розчину.

Після цього вимірювали оптичну густина розчину дезоксигемоглобіну при $\lambda = 558$ нм. Додаванням дозованих порцій повітря збільшували парціальний тиск кисню. Після термостатування протягом 5 хв вимірювали оптичну густина розчину. Реєстрували 6–8 вимірів, на основі яких будували криві дисоціації оксигемоглобіну, тобто криві залежності насичення гемоглобіну киснем (у %) від парціального тиску кисню (мм рт. ст.). З побудованих кривих графічно визначали показник P_{50} . P_{50} є основним показником, за яким визначається спорідненість гемоглобіну до кисню.

2.13. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну

Вміст глікозильованого гемоглобіну визначаємо спектрофотометрично. Для цього 3-5 мл гепаринізованої крові центрифугуємо 15 хв при 3000 об/хв. Відбираємо плазму. Отриману еритроцитарну масу тричі промиваємо фізіологічним розчином під час центрифугування протягом 5 хв при 3000 об/хв. Відмиті еритроцити гемолізують дистильованою водою у співвідношенні 1:3 і центрифугують при 18 000 об/хв 15 хв. До 2 мл отриманого супернатанту додають 1 мл 0,3 М щавлевої кислоти та інкубують отриману суміш при 100 °С протягом 1 год, охолоджують і додають 1 мл 40% трихлороцтової кислоти (ТХО). Суміш ретельно збовтують і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. До 2 мл отриманого супернатанту додають 0,5 мл 0,05 М тіобарбітурової кислоти і суміш інкубують при 40 °С протягом 40 хв. Через 20 хв після закінчення інкубації визначають оптичну густина розчину у кюветах з відстанню між робочими гранями 1 см проти дистильованої води при $\lambda=443$ нм. Вміст глікозильованого гемоглобіну визначають у % за пропорцією, враховуючи що оптична густина 0,029 відповідає 1% глікозильованого гемоглобіну [122].

2.14. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів

Принцип методу ґрунтується на активації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) іонами двовалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. За високої температури в кислому середовищі продукти ПОЛ реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворюючи забарвлений триметиний комплекс з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм.

До 0,2 мл лізату лейкоцитів додавали 3 мл 10 мМ К-На-фосфатного буферу, приготованого на 125 мМ КСl (рН 7,4). Для індукції ПОЛ додавали 0,5 мл 1мМ КМnО₄, та двічі з інтервалом у 10 хвилин по 0,5 мл 10мМ FeSO₄. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 % ТХО. Осад відцентрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хв. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1н НСl і 1 мл 0,7 % ТБК та інкубували при 100°C протягом 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, перемішували і центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв. Вимірювання екстинкції проводили у верхньому бутаноловому шарі при $\lambda=532$ нм. Обрахунок проводили за формулою:

$$[\text{ТБК-пп}] = \frac{E \times V_1 \times V_2}{\varepsilon \times V_3 \times C}$$

де [ТБК-пп] – концентрація ТБК-позитивних продуктів; E – екстинкція дослідної проби; ε – молярний коефіцієнт екстинкції, $156000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; V₁ – об'єм бутанолу; V₂ – об'єм лізату; V₃ – об'єм супернатанту; C – концентрація білка в досліджуваній пробі, мг×мл⁻¹.

Отримані результати виражали в мкмоль×мг⁻¹ білка [9]

2.15. Визначення концентрації білка

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [84]. Результат виражали у мг білка × мл зразка.

2.16. Визначення активності каталази

Принцип методу ґрунтується на здатності Н₂О₂ утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Каталаза (КФ 1.11.1.6), розкладаючи

перекис водню до води і кисню, зменшує інтенсивність забарвлення, яке залежить від кількості H_2O_2 в розчині [5].

У пробірки додавали 0,5 мл 0,05 М Tris-HCl (рН 7,8) і 1 мл 0,03% розчину H_2O_2 . У дослідну пробу додавали 50 мкл зразка (лізату лейкоцитів). Всі проби інкубували 10 хв при 37 °С, після чого додавали 0,5 мл 4% розчину молібдату амонію. Після цього, в холості проби додавали 50 мкл зразка і негайно вимірювали оптичну густину дослідних і холостих проб проти дистильованої води при $\lambda=410$ нм. Активність каталази (у мкмоль H_2O_2 за 1 хв \times мг білка) визначали за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times V \times n}{\varepsilon \times C \times t \times \alpha \times l}$$

де ΔE – різниця екстинкції холостої та дослідної проб; V – загальний об'єм суміші в кюветі; n – розведення вихідного зразка; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу H_2O_2 з молібдатовим амонієм, дорівнює $22\,200 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, у розрахунках використовували мілімолярний коефіцієнт екстинкції $22,2 \text{ см}^2/\text{мкмоль}$; C – концентрація білка в зразку; t – час реакції; α – об'єм зразка; l – довжина оптичного шляху.

2.17. Визначення активності супероксиддисмутази (СОД)

Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) визначали методом, в основі якого лежить здатність СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніонрадикали, які утворюються у результаті аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату. В результаті цієї реакції нітросиній тетразолій відновлюється з утворенням гідрозинтетразолію (нітроформазау). Активність ферменту визначали за відсотком блокування утворення нітроформазау, оскільки за присутності СОД активність відновлення нітросинього тетразолію знижується [10].

Активність СОД визначали в лізатах лейкоцитів. До 0,75 мл інкубаційної суміші (39 мМ ЕДТА-На, 114 мМ нітротетразолій синій (мета-форма), 54 мМ феназинметасульфат, розчинені у 0,15 М Na-K-фосфатному буфері (рН 7,8)) додавали 0,05 мл лізату лейкоцитів та 0,025 мл 2 мМ розчину НАДН (дослідна

проба). У холосту пробу замість лізату вносили 0,05 мл dH₂O. Зразки інкубували 10 хв при 37 °С і проводили вимірювання екстинкції при $\lambda = 540$ нм.

Супероксиддисмутазну активність визначали за формулою:

$$\% \text{блокування} = \frac{E_{\text{х.пр}} - E_{\text{д.пр}}}{E_{\text{х.пр}}}$$

де $E_{\text{х.пр}}$ та $E_{\text{д.пр}}$ – екстинкція холостої та дослідної проб відповідно. Результат виражали в умовних одиницях (1 у.о. = 50% блокування реакції утворення нітроформазау) на 1 мг білка.

2.18. Визначення активності мієлопероксидази

Активність мієлопероксидази (КФ 1.11.2.2) у лізатах лейкоцитів та плазмі крові визначали спектрофотометрично. Для цього до 10 мкл дослідного зразка (плазми крові або лізату клітин) додавали 290 мкл 50 мМ фосфатного буферу (рН 6,0), що містив 0,3 мМ H₂O₂ та 0,68 мМ о-діанізидину. Активність ферменту досліджували за зміною оптичної густини дослідної проби при $\lambda = 450$ нм протягом 5 хв при 37°С, отримані результати виражали у нмоль H₂O₂/хв×мг білка [91].

2.19. Визначення вмісту окисно модифікованих білків (ОМБ)

В процесі окиснювальної модифікації білків в радикалах залишків аліфатичних амінокислот утворюються альдегідні і кетонні групи, які можуть взаємодіяти з 2,4-динітрофенілгідразиним (ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерні піки поглинання.

У пробірки вносили 0,8 мл 0,85% NaCl, 0,2 мл лізату лейкоцитів, 1 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2 Н HCl і 1 мл 10% трихлороцтової кислоти (ТХО). У контрольну пробу замість 2,4-ДНФГ вносили 1 мл 2 Н HCl. Проби інкубували 1 год при 37°С, після чого центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Осад промивали тричі 5% ТХО, додавали 5 мл 8М розчину сечовини та інкубували 5 хв у киплячій водяній бані до повного розчинення. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували при $\lambda = 370$ (альдегідо- і кетопохідні

нейтрального характеру – ОМБ₃₇₀) та $\lambda=430$ нм (похідні основного характеру - ОМБ₄₃₀). Вміст ОМБ₃₇₀ виражали як мкмоль карбонільних груп білків на 1 мг білка, використовуючи молярний коефіцієнт абсорбції $22\ 000\ \text{M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$, а вміст ОМБ₄₃₀ виражали в у.о. карбонільних груп білків на 1 мг білка [7].

2.20. Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидації білків

Вміст кінцевих продуктів оксидації білків (Advanced Oxidation Protein Products, AOPPs) визначали згідно методики Witko-Sarsat [127] у модифікації Kalousova [65]. У 96-лунковому мікропланшеті у холосту пробу вносили 0,2 мл PBS, а в дослідні проби – 0,05 мл лізату лейкоцитів або плазми крові і 0,15 мл PBS. У всі проби додавали 0,01 мл 1,16 М калій йодиду (KI) і 0,02 мл концентрованої оцтової кислоти. Оптичну густину визначали при $\lambda=340$ нм. Вміст кінцевих продуктів оксидації білків виражали у мкмоль хлораміну на 1 г білка.

2.21. Визначення вмісту кінцевих продуктів глікозилювання білків

Вміст продуктів глікації білків (Advanced Glycation End products, AGEs) визначали згідно методики, описаної у Putta et al [103]. Лізати лейкоцитів розводили у 20 разів у 0,1 н NaOH, а плазму крові – у 50 разів у PBS. Як стандарт використовували розчин бичачого сироваткового альбуміну (BSA) (1 мг/мл у 0,1 н NaOH), який приймався за 1 одиницю флюоресценції (AU). Вміст AGEs у досліджуваних зразках визначали шляхом вимірювання флюоресценції збудження при $\lambda=370$ нм та емісії при $\lambda=440$ нм. Вміст AGEs виражали у AU на 1 мг білка.

2.22. Імунодетекція RAGE

Зразки плазми розводили дистильованою водою до отримання концентрації білка 50 мкг на 20 мкл та піддавали SDS-ПААГ електрофорезу. Білки розділяли у блоках 15%-го поліакриламідного гелю за наявності додецилсульфату натрію (SDS) у буферній системі Лемлі. До 20 мкл зразка

додавали рівний об'єм буферу Лемлі (62,5 мМ Tris-HCl, рН 6,8; 25% гліцерин; 2% SDS; 0,01% бромфеноловий синій; 5% β -меркаптоетанол) та інкубували 10 хв при 70 °С.

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 Tris-HCl, рН 8,8;
3. Буфер «Б» для концентруючого гелю: 0,125 М Tris-HCl, рН 6,8;
4. 10% персульфат амонію (APS);
5. 10% SDS;
6. Буфер для електрофорезу (0,025 М Tris-HCl, рН 8,3, 0,192 М гліцин, 0,1% SDS).

В установку для електрофорезу, у простір між двома скляними пластинами вносили 15%-вий розділяючий (3,28 мл H₂O; 2,64 мл «АА»; 2 мл «А»; 0,8 мл SDS; 0,4 мл APS; 0,04 мл TEMED) та 5%-вий концентруючий (1,83 мл H₂O; 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 [42].

Після електрофоретичного розділення білків плазми крові, здійснювали перенесення білків з ПААГ під дією електричного поля на нітроцелюлозну мембрану з наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Перенесення проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА, в буфері, що містив 25 мМ Tris-HCl (рН 8,3), 20% метанол та 192 мМ гліцин. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 12 год при 4°C 5% розчином сухого знежиреного молока в PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, (рН 7,3)) з 0,05% Tween-20. Згідно до поставленої мети мембрану інкубували з першими антитілами (AGER rabbit polyclonal antibodies (с.п. 16346-1-AP, Proteintech, China)), розведеними у 1000 раз у блокуючому буфері, протягом 1,5 год з наступним промиванням буфером для блокування (5 разів по 3 хв). Як другі

антитіла використовували анти-кролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – peroxidase, Sigma, США), в розведенні у 10000 разів у блокуючому буфері. Інкубацію з другими антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали PBS/0,1% Tween-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 фенідонгідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз результатів вестерн-блотингу здійснювали з використанням програми GelPro 3.1. [78; 79]

2.23. Визначення вмісту нітрит-аніонів (NO_2^-)

Вміст нітрит-аніону визначали в зразках лізатів лейкоцитів. Депротейнізацію проводили додаванням до зразків 96 % етанолу з наступним центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 20 хв при 20°C. У лунки мікропланшету вносили 100 мкл отриманого супернатанту та аналогічний об'єм реактиву Гріса (0,05 % N (1-нафтил)-етилендіамін та 1 % сульфаніламід у 12 % оцтовій кислоті у співвідношенні 1:1). Контрольна проба замість зразка містила 100 мкл дистильованої води. Вміст лунок інкубували 30 хв при 37°C та вимірювали абсорбцію при $\lambda=540$ нм. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували з використанням стандартних розчинів нітриту натрію [90].

2.24. Визначення активності сумарної та індукбельної NO-синтази (NOS)

Визначення активності сумарної NO-синтази. До відібраного супернатанту з лізатів лейкоцитів додавали 10 мМ HEPES буфер, що містив 1 М MgCl_2 , 1 М CaCl_2 , 3 мМ L-аргінін та 0,1 мМ $\text{NADPH}(\text{H}^+)$. Як контроль використовували проби, що містили повну субстратну суміш та H_2O . Після 30 хв інкубації зразків при 37°C зупиняли реакцію додаванням 96% етанолу в пропорції 1:4 і

центрифугували 20 хв при 3000 об/хв. В пробірки вносили по 100 мкл супернатанту та 100 мкл реактиву Гріса. Інкубували 30 хв при 37°C, після чого вимірювали світлопоглинання при $\lambda=540$ нм. Сумарну активність ензиму у пробі виражали в нмолях новоутвореного NO_2^- за 1 хв на 1 мг білка.

Визначення активності індукцибельної NO-синтази. Методика визначення аналогічна до попередньої, проте для визначення активності Ca^{2+} -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 додавали ЕДТА [90, 37].

2.25. Визначення активності поглинання глюкози

Поглинання глюкози клітинами досліджували за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням барвника 2-NBDG (2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)-D-Glucose) як описано тут [34] з деякими модифікаціями. Свіжовиділені лейкоцити у кількості 500 тис клітин інкубували протягом 30 хв при 37 °C у 50 мкл 0,1М Кребс-Рінгер-фосфатного буферу (pH 7,2-7,4) з додаванням 1,25 мкл 20 мМ 2-NBDG. Після цього клітини тричі відмивали від барвника шляхом додавання 500 мкл Кребс-Рінгер-фосфатного буферу і центрифугування протягом 5 хв при 3000 об/хв. Відмиті лейкоцити у кількості 100 тис клітин наносили краплею на предметне скло, залишали на 2-3 хв для осідання та аналізували з допомогою інвертованого мікроскопа Olympus IX73, оснащеним камерою DP74. Отримані фотографії аналізували за допомогою програми ImageJ (версія 1.53e) (НИН, США). Активність флуоресценції 2-NBDG виражали в умовних одиницях (AU).

2.26. Визначення вмісту АТФ

Вміст АТФ у лізатах лейкоцитів визначали з використанням набору АТФ Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (CN MAK190, Sigma-Aldrich, США) згідно інструкції виробника. Лейкоцити у кількості 2×10^6 лізували у 50 мкл лізуючого буфера як описано у п. 2.5; 50 мкл отриманого супернатанту використовували для аналізу. Вміст АТФ у клітинах виражали у нг АТФ на 1 мкл лізату лейкоцитів.

2.27. Визначення вмісту АФО

Вміст АФО у лейкоцитах визначали за активністю флуоресценції барвника 2',7'-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)) за методом [118] з деякими модифікаціями. Клітини у кількості 2×10^6 інкубували в темряві протягом 30 хв при 37°C у 1 мл PBS буферу, який містив 5 μ M H2DCFDA. Після цього клітини промивали 1 раз 0,5 мл PBS буферу центрифугуючи протягом 5 хв при 3000 об/хв. Лейкоцити у кількості 200 тис клітин наносили краплею на предметне скло, залишали на 2-3 хв для осідання та аналізували з допомогою мікроскопа Nikon Optiphot-2, оснащеним лампою HB-10101AF та камерою DCM310. Отримані фотографії аналізували за допомогою програми ImageJ (версія 1.53e) (NIH, США). Активність флуоресценції H2DCFDA виражали в умовних одиницях (AU).

2.28. Дослідження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів

Поліморфноядерні лейкоцити та моноцити периферичної крові здатні зв'язувати на своїй поверхні, захоплювати і перетравлювати мікробну тест-культуру.

Об'єкт фагоцитозу готували згідно [116]. Перед дослідом готували суспензію дріжджів з концентрацією клітин 40×10^6 в 1 мл. Для цього 4 мг свіжих дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) розчиняли в 4 мл води. Для дослідження об'єктів фагоцитозу повинно бути у 5 разів більше, ніж нейтрофільних гранулоцитів.

Після інкубації 5-10 хв при 37°C з перемішуванням відбирали 0,4 мл суспензії дріжджів, додавали до неї 0,4 мл 2% трипанового синього і проварювали для інактивації 5 хв при 90°C постійно струшуючи пробірку. Далі відмивали дистильованою водою об'єкт фагоцитозу від надлишку фарби центрифугуванням впродовж 5 хв при 1500 об/хв поки надосадова рідина не знебарвлювалась. Отриманий осад пофарбованих дріжджів ресуспендували в 0,4

мл PBS і використовували для дослідження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів.

У дві пробірки вносили по 50 мкл лейкоконцентрату (3×10^6 клітин/мл), до якого додавали 5 мкл робочої суспензії дріжджів. Інкубували при температурі 37°C , першу пробірку – 30 хв, другу – 120 хв. Потім центрифугували впродовж 3 хв при 2000 об/хв. З осаду клітин виготовляли мазки. Мазки висушували, фіксували метанолом. Після повного випаровування метанолу на предметне скло наносили 70% етанол. Поступово по краплях додавали воду, потім її зливали. Далі проводили фарбування клітин за Романовським-Гимзою протягом 40 хв. Мазки ретельно промивали дистильованою водою та висушували. Розглядали під імерсією зі збільшенням 14×100 . При цьому звертали увагу на кількість фагоцитуючих нейтрофільних гранулоцитів та кількість фагоцитованих частинок.

Фагоцитарний показник (ФП) (відсоток фагоцитозу) визначали відношенням середньої кількості клітин, що вступили у фагоцитоз до загальної кількості підрахованих нейтрофілів:

$$\text{ФП} = \frac{x}{200}$$

де x – кількість фагоцитуючих клітин.

ФЧ (фагоцитарне число) – середня кількість клітин дріжджів, поглинених фагоцитуючою клітиною;

Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) визначали за формулою:

$$\text{ІЗФ} = \frac{x_{30\text{хв}}}{x_{120\text{хв}}}$$

де $x_{30\text{хв}}$ – середня кількість поглинених клітин дріжджів через 30 хв інкубації;

$x_{120\text{хв}}$ – середня кількість фагоцитованих клітин через 120 хв інкубації.

2.29. Визначення бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів по реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ–тест)

Тест відновлення нітросинього тетразолію (НСТ–тест) дає можливість судити про фагоцитарну та бактерицидну функції гранулоцитів за утворенням в цитоплазмі гранул формагану [24].

У лунку скляної пластинки вносять 0,025 мл розчину гепарину (20-25 ОД / мл), 0,1 мл крові, 0,05 мл 0,15 М фосфатного буфера (рН 7,2) і 0,05 мл 0,2% розчину тетразолію. Вміст лунки перемішують за допомогою піпетки. Пластинку накривають фільтрувальним папером, змоченим 0,85% розчином NaCl і скляною пластинкою відповідних розмірів. Для створення вологої камери скляну пластинку притискають за допомогою пружинних зажимів. Інкують в термостаті при 37° С протягом 15 хв, потім при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після кожного етапу інкубації суміш перемішують пастерівською піпеткою (продуваючи повітря). Готують мазки, висушують, фіксують метанолом і дофарбовують 2% розчином метилового зеленого.

Оцінку цитохімічних досліджень здійснювали напівкількісним методом, використовуючи принцип Астральді, який базується на диференціюванні різного ступеня інтенсивності специфічного забарвлення (0, +, ++, +++). Результат виражали в СЦК – середній цитохімічний коефіцієнт, який розраховували за формулою:

$$\text{СЦК} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}$$

де А – клітини з від'ємною реакцією, В – клітини зі слабкопозитивною реакцією, С – помірнопозитивною реакцією, D – різко позитивною. 100 – кількість підрахованих клітин певного виду

2.30. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою пакету аналізу даних програми Microsoft Excel 2016. Обчислення основних статистичних показників проводили на основі безпосередніх кількісних даних, отриманих в результаті експериментів (середнє арифметичне значення – М;

стандартна похибка середнього арифметичного – m). Різницю показників оцінювали методами варіаційної статистики за критерієм Стюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив ФБМТ на окремі гематологічні показники

Гемоглобін є основним білком еритроцитів. Цей складний білок містить простетичну групу – гем. Гем є комплексом протопорфірину IX, що належить до класу порфіринових сполук, з атомом заліза (II). Така забарвлена сполука як гемоглобін могла б стати хорошим кандидатом на роль хромофора для ФБМТ у крові. Однак, за нормальних умов гемоглобін міститься у еритроцитах та не вивільняється назовні з клітин. Тому ми також звернули увагу на речовину-попередник у шляху синтезу гему – протопорфірин IX (PPIX.)

Як видно із графіка спектра поглинання (Рис. 3), протопорфірин має один з піків поглинання при довжині хвилі 628,38 нм, що співпадає із спектром випромінювання нашого приладу. Тому протопорфірин може слугувати первинним акцептором світлової енергії для ФБМТ, та, окрім того, проявляти фотодинамічний ефект, що може пояснити біологічні ефекти ФБМТ.

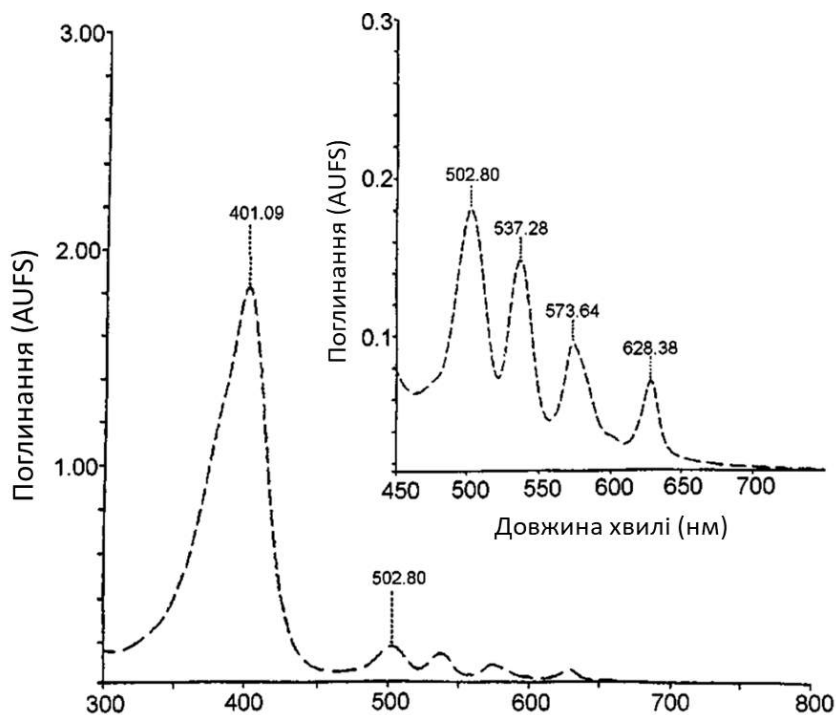


Рис. 3. Спектри поглинання протопорфірину [83].

Для перевірки цієї гіпотези ми вирішили дослідити вплив ФБМТ на деякі гематологічні показники та вміст протопорфірину у крові щурів за умов ЦД.

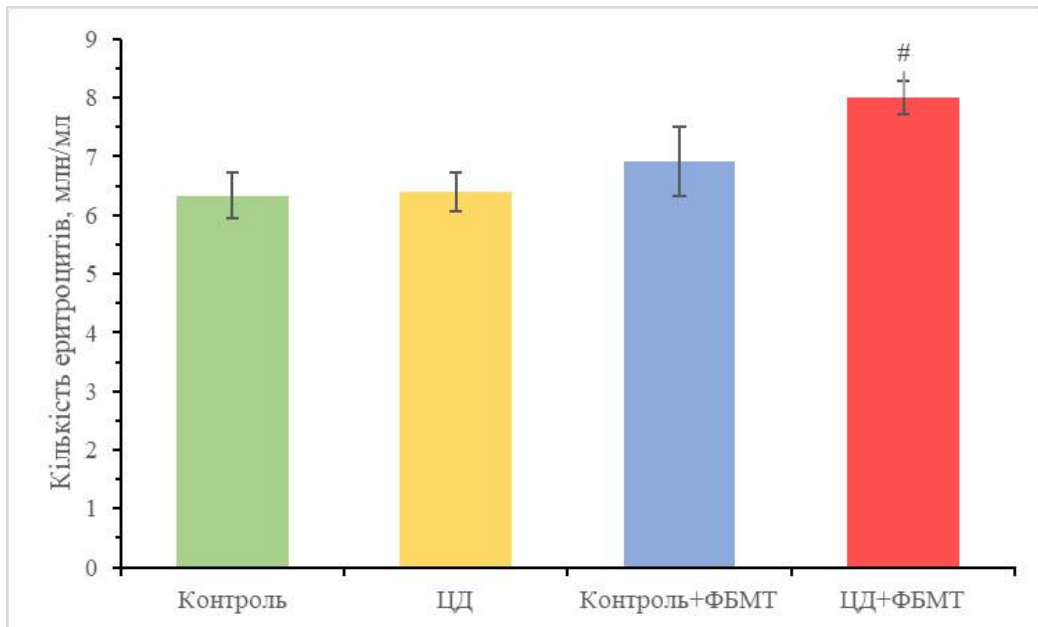


Рис. 4. Кількість еритроцитів, млн/мл

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

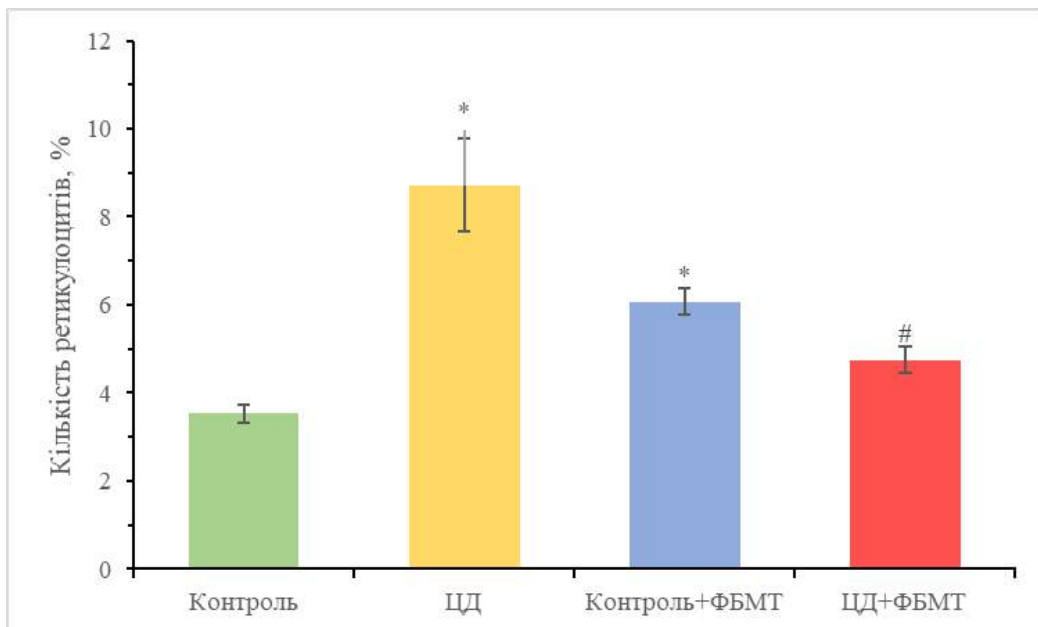


Рис. 5. Кількість ретикулоцитів, %

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

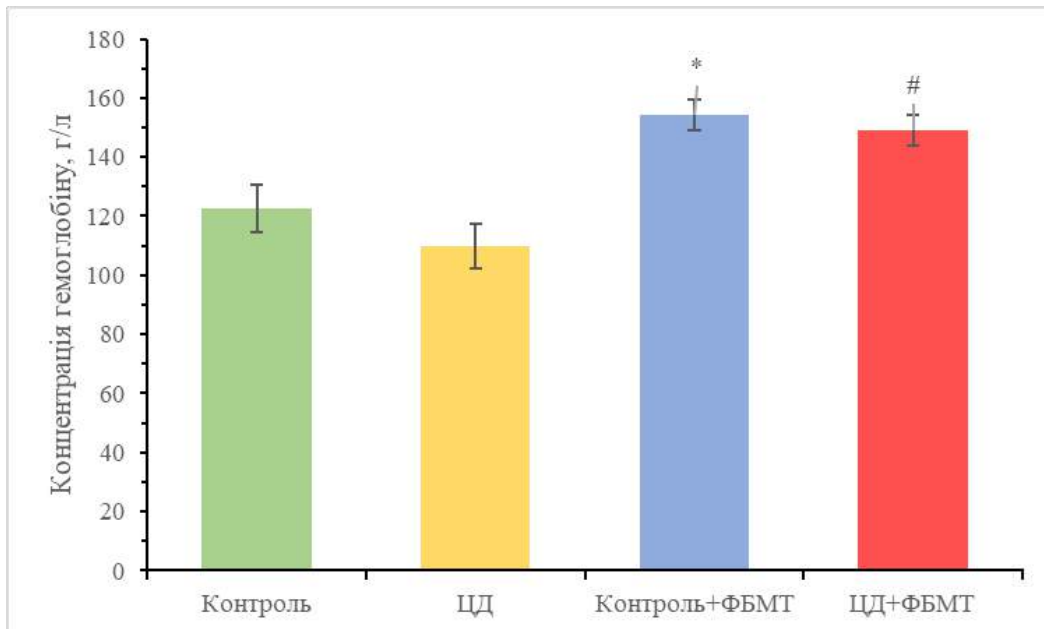


Рис. 6. Концентрація гемоглобіну, г/л

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Ми виявили, що за умов опромінення у здорових тварин зростає концентрація гемоглобіну у 1,26 рази (Рис. 6) та кількість ретикулоцитів у 1,72 рази (Рис. 5) порівняно з контролем. У тварин з ЕЦД ФБМТ викликає підвищення кількості еритроцитів у 1.25 рази (Рис. 4), концентрації гемоглобіну у 1.36 рази, зниження вмісту ретикулоцитів у 1.84 рази порівняно зі значеннями у групі неопромінених тварин (Рис. 5-6). Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті не зазнавав достовірних змін у жодній з досліджуваних груп. Слід відмітити, що зміна кількості ретикулоцитів за умов опромінення була різноспрямованою у здорових тварин та тварин з ЕЦД. Так, зростання їхньої кількості за дії ФБМТ у здорових тварин може свідчити про інтенсифікуючий вплив цього чинника на еритропоез, а зниження кількості ретикулоцитів у щурів з ЦД та наближення її до контрольних значень – про позитивний коригуючий ефект випромінювання досліджуваного діапазону спектра, адже відомо, що за умов ЦД спостерігається надмірне виснаження системи еритропоезу.

Основним показником, що характеризує структурно-функціональний стан мембрани еритроцитів периферичної крові, є її стійкість до ушкоджуючої дії

факторів різної природи. Дослідження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика є досить простим і поширеним методом, який дає змогу диференціювати еритроцити за гемолітичною стійкістю. Функціональнозрілі еритроцити характеризуються високою стійкістю до кислотного гемолітика, займаючи на еритрограмі центральне положення. Їх старіння або вихід у кров функціонально незрілих клітин супроводжуються зниженням їхньої резистентності, що на еритрограмі позначається зміщенням ліворуч. Це може свідчити як про порушення кістково-мозкового кровотворення, так і про наявність у крові речовин, які змінюють стійкість еритроцитів. Аналіз кислотних еритрограм проводили за такими показниками: тривалість гемолізу, пік гемолізу, максимальна кількість гемолізованих еритроцитів за 30 с.

Ми виявили зниження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов ЦД, а саме, скорочення тривалості гемолізу до 6,52 хв, тоді як у контролі він становив 9,5 хв (Рис. 7); еритрограма зсувалася вліво з піком гемолізу на 3,5-й хвилині порівняно з контролем, де пік він припадав на 4-ту хвилину (Рис. 8). Також збільшувалася максимальна кількість гемолізованих еритроцитів за 30 с у 1.23 рази порівняно з контролем.

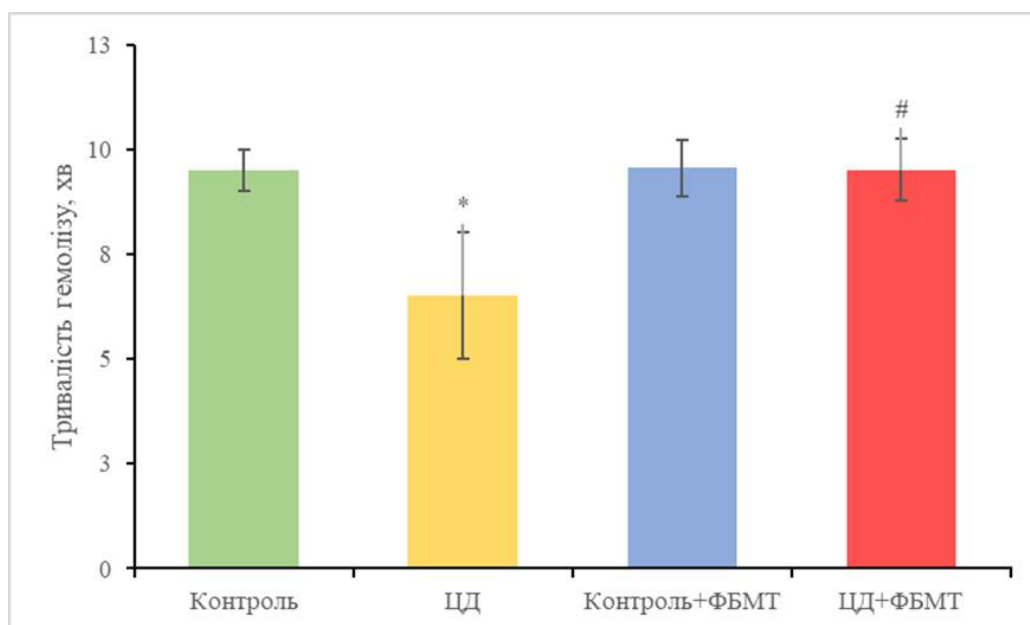


Рис. 7. Тривалість гемолізу еритроцитів, хв

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

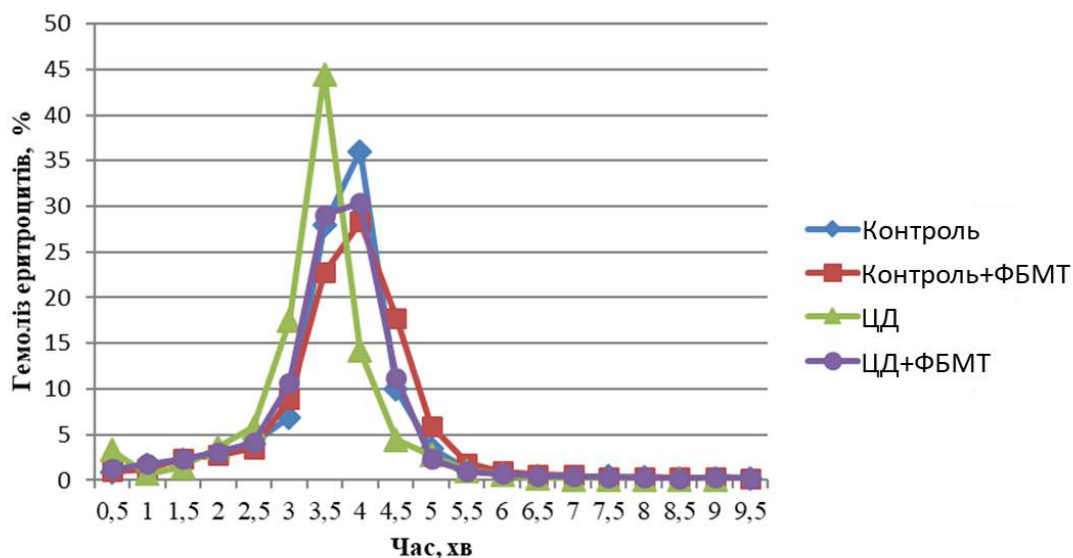


Рис. 8. Типові кислотні еритрограми щурів за дії ФБМТ.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

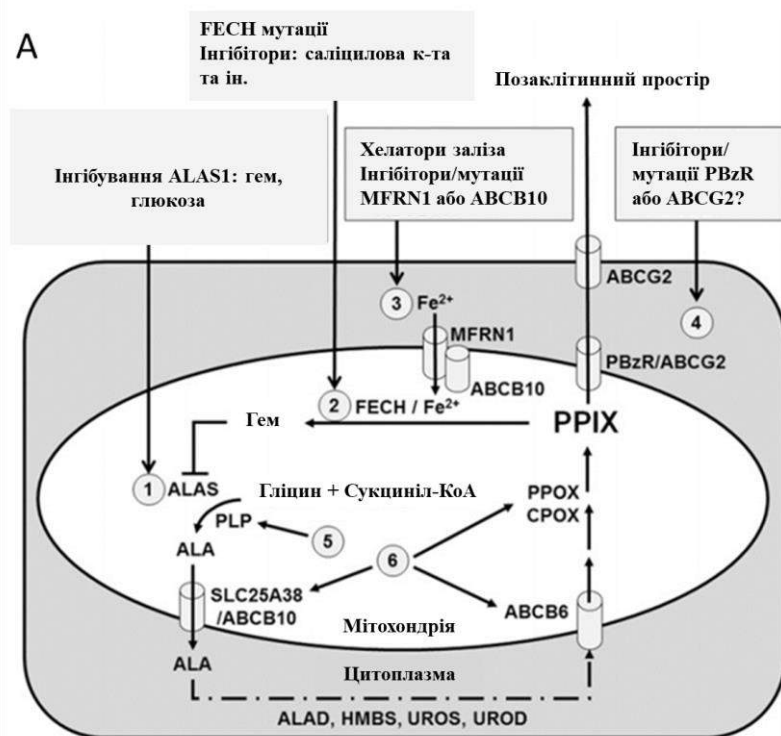
Зменшення тривалості гемолізу еритроцитів, підвищення його піка і зсув еритрограми вліво за умов ЦД порівняно з контролем опосередковано свідчать про пришвидшення фізіологічного старіння еритроцитів на тлі досліджуваної патології. На ці зміни, окрім процесів неензиматичного глікозилювання білків еритроцитарних мембран, найімовірніше, впливає активація процесів перекисного окиснення ліпідів та розвитку оксидативного стресу, яка відбувається за ЦД. Таким чином, зміни фізико-хімічної структури клітинних мембран еритроцитів за умов досліджуваної патології призводять до порушення функціонального стану еритроцитів та їхньої дисфункції.

При опроміненні червоним світлом здорових тварин зменшувалася максимальна кількість гемолізованих еритроцитів, всі інші показники гемолізу залишалися на рівні контролю. Натомість у тварин з ЦД збільшувався час гемолізу до 9,5 хв, відбувався зсув еритрограми праворуч та зменшувалася кількість гемолізованих еритроцитів за 30 с у 1,46 рази порівняно зі значеннями у неопромінених тварин. Пік гемолізу припадає на 4-ту хвилину, як і у контролі. Отримані нами результати вказують на позитивний коригуючий ефект ФБМТ на

фізико-хімічний стан мембран еритроцитів щурів, який виявляється у зростанні стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика за умов ЦД.

Окрім того, що протопорфірин синтезується у всіх тканинах організму (приблизно 85% в кістковому мозку, а більша частина решти – у печінці) та здатен транспортуватися з клітин назовні у міжклітинний матрикс або кров, його досліджують як активний хромофор у фотодинамічних дослідженнях. Біосинтез гему починається в матриксі мітохондрій (Рис. 9А), де одна молекула гліцину поєднується з однією молекулою сукциніл-КоА з утворенням d-амінолевулінової кислоти (ALA). Цей етап каталізується синтазою ALA (ALAS) у присутності кофактора піридоксальфосфату. ALAS – це лімітуючий фермент у продукції PPIX та синтезі гему.

Є два основні шляхи для клітинного розподілу PPIX: синтез гему або виведення з клітини. PPIX у більшості тканин ефективно перетворюється на гем за наявності заліза. PPIX, що залишився в мітохондріях може транспортуватися в позаклітинний простір через члена підродини АТФ-зв'язуючої касети G 2 (ABCG2) та периферичний рецептор бензодіазепіну (PBzR).



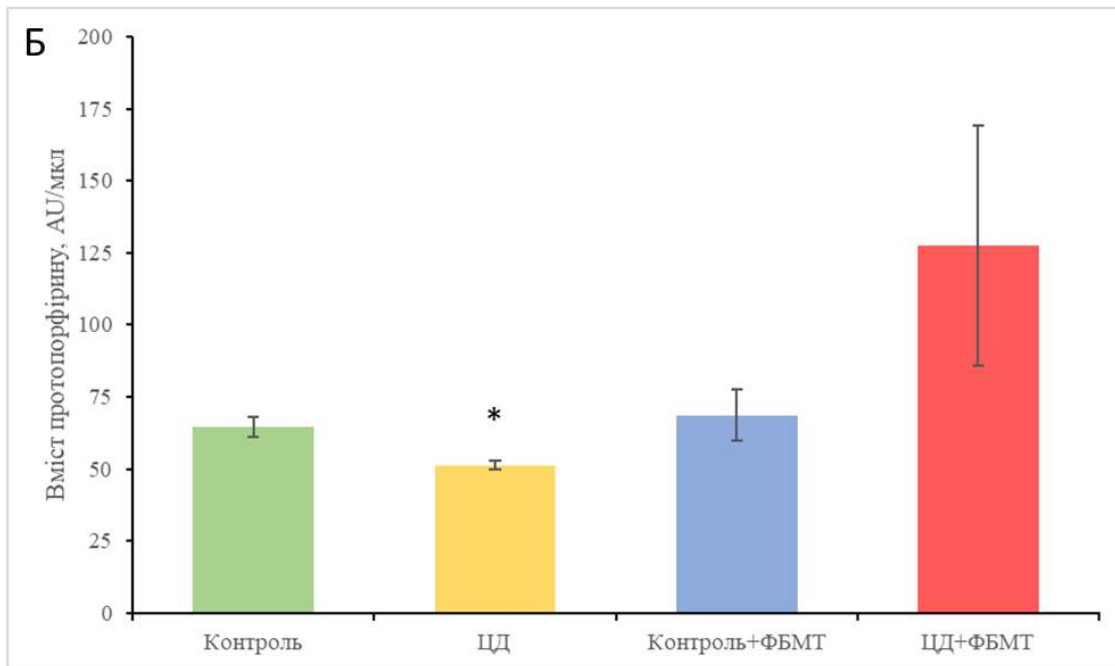


Рис. 9. Схема біосинтезу гему (А) [108] та вміст протопорфірину у цільній крові, АУ/мкл (Б)

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Ми виявили, що при ЦД вміст протопорфірину знижується у 1,3 рази порівняно з контролем (Рис. 9Б). Також спостерігається тенденція до підвищення цього показника при опроміненні тварин з ЦД. Такі дані можна було б пояснити загальною цукрознижувальною активністю ФБМТ, адже відомо, що підвищений вміст глюкози у крові інгібує активність ферменту ALAS, який залучений у процес біосинтезу гему.

Характерним та надзвичайно важким ускладненням ЦД є так званий «синдром діабетичної стопи». Гіперглікемія та пов'язані з нею зміни в метаболізмі глюкози викликають пошкодження ендотелію, гіперліпідемію та розвиток атеросклерозу. З розвитком дифузної оклюзійної хвороби великогомілкової артерії або більш проксимальної артеріальної оклюзії перфузія стопи стає недостатньою для підтримки цілісності шкіри, що може призвести до ішемічної виразки або гангрені [23]. Окрім цього, свій внесок у розвиток цього ускладнення робить порушення кисеньтранспортної функції еритроцитів за ЦД

через підвищену спорідненість глікозильованого гемоглобіну до кисню [100]. Крива дисоціації оксигемоглобіну (КДО) відображає насичення гемоглобіну киснем (вісь у) як функцію парціального тиску кисню (вісь х). Сигмовидна або S-форма кривої зумовлена позитивною кооперативністю гемоглобіну. Важливим показником ступеня спорідненості гемоглобіну до кисню є P_{50} – значення pO_2 , за якого гемоглобін вивільняє 50% зв'язаного кисню. В результаті проведених досліджень встановлено, що за ЦД відбувається зсув КДО вліво та зниження P_{50} у 1,4 раза порівняно з контролем (Табл. 1.).

Група тварин	P_{50}, (М ± m)
Контроль	26,29 ± 2,68
Контроль+ФБМТ	20,00 ± 1,61*
ЦД	18,71 ± 1,05*
ЦД+ФБМТ	21,75 ± 1,06 [#]

Табл. 1. Значення P_{50} за досліджуваних умов (мм рт. ст.)

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

[#] – різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Зсув положення КДО ліворуч свідчить про розвиток в організмі гіпоксичного стану. У підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню вносить свій вклад збільшення вмісту метгемоглобіну та глікозильованого гемоглобіну за ЦД. Це перешкоджає алостеричній регуляції кисеньтранспортної функції оксигемоглобіну за участю 2,3-дифосфогліцерату.

За впливу ФБМТ на здорових тварин відбувається зсув КДО ліворуч та зменшення P_{50} у 1,31 раза, тоді як за дії опромінення на тварин з ЦД – зсув КДО праворуч та збільшення P_{50} у 1,16 раза порівняно зі значеннями у неопромінених тварин (Рис. 10.).

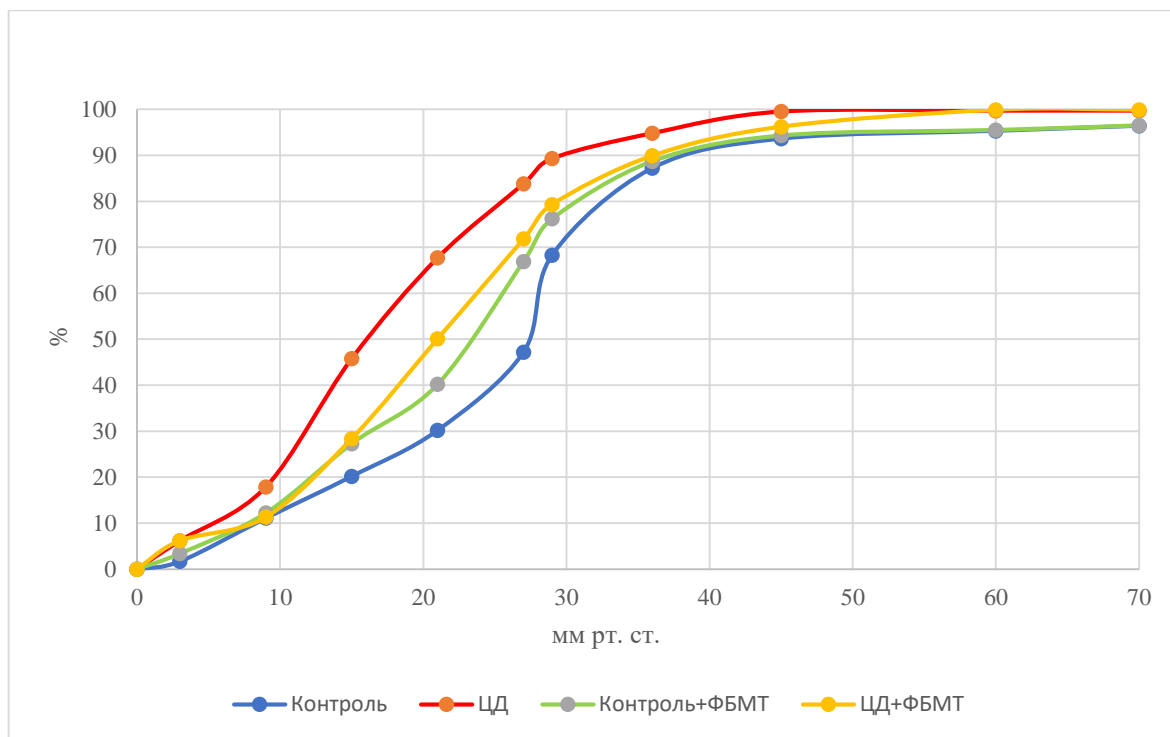


Рис. 10. Типові криві дисоціації оксигемоглобіну щурів у контролі та за умов ЦД , а також на фоні впливу ФБМТ.

Абсорбційні спектри гемоглобіну та оксигемоглобіну мають найбільший інтервал за довжин хвилі між 630 і 670 нм. Ймовірно за дії ФБМТ цими довжинами хвиль покращується здатність крові транспортувати кисень [128]. При аналізі впливу низькоінтенсивного опромінення різних довжин хвиль на спектри поглинання крові та гемоглобіну виявлено, що лазери з максимумами довжин хвиль 200–240, 275 і 342 нм легко руйнують молекули білка, а потім призводять до того, що гемоглобін втрачає біологічну активність. У той час як лазери з довжиною хвилі більше 800 нм знижують здатність крові транспортувати кисень, а найкращу ефективність мають лише лазери з довжиною хвилі від 630 до 670 нм [131].

Збільшення P_{50} зумовлено фотодисоціацією оксигемоглобіну з вивільненням кисню і переходом гемоглобіну у дезоксигемоглобін. Отже, таким чином можна контролювати локальну концентрацію вільного молекулярного кисню у тканинах. Додаткове вивільнення кисню запобігає розвитку тканинної гіпоксії та стимулює аеробний метаболізм клітин.

Щоб детальніше дослідити вплив ФБМТ на систему крові ми вирішили перевірити склад лейкоцитарної формули крові за досліджуваних умов. Ми виявили достовірне збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів (у 1,23 раза), та зменшення лімфоцитів (у 1,05 раза) у щурів з ЦД за дії ФБМТ (Табл. 2.).

	Контроль	ЦД	Контроль+ФБМ Т	ЦД+ФБМТ
	M±m	M±m	M±m	M±m
Нейтрофіли П-Я	1,00±0,63	1,36±0,26	1,13±0,41	1,65±0,46
Нейтрофіли С-Я	17,90±1,40	15,81±1,77	18,43±2,48	22,03±1,76*
Лімфоцити	73,14±0,82	75,48±1,40	74,82±2,20	69,63±1,56*
Еозинофіли	2,40±0,37	3,23±0,46	1,73±0,56	2,20±0,28
Моноцити	5,58±0,69	4,10±0,53	3,20±0,41	4,45±0,56
Базофіли	0,00±0,00	0,06±0,06	0,75±0,75	0,05±0,05

Табл. 2. Лейкоцитарна формула крові, %.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Такі результати можуть свідчити про інтенсифікацію вродженої ланки імунітету за ЦД та дії опромінення та, що найголовніше, потенційну активізацію розвитку оксидативно-нітративного стресу, оскільки нейтрофільні гранулоцити здатні продукувати велику кількість АФО у відповідь на стимуляцію.

Підсумки до розділу:

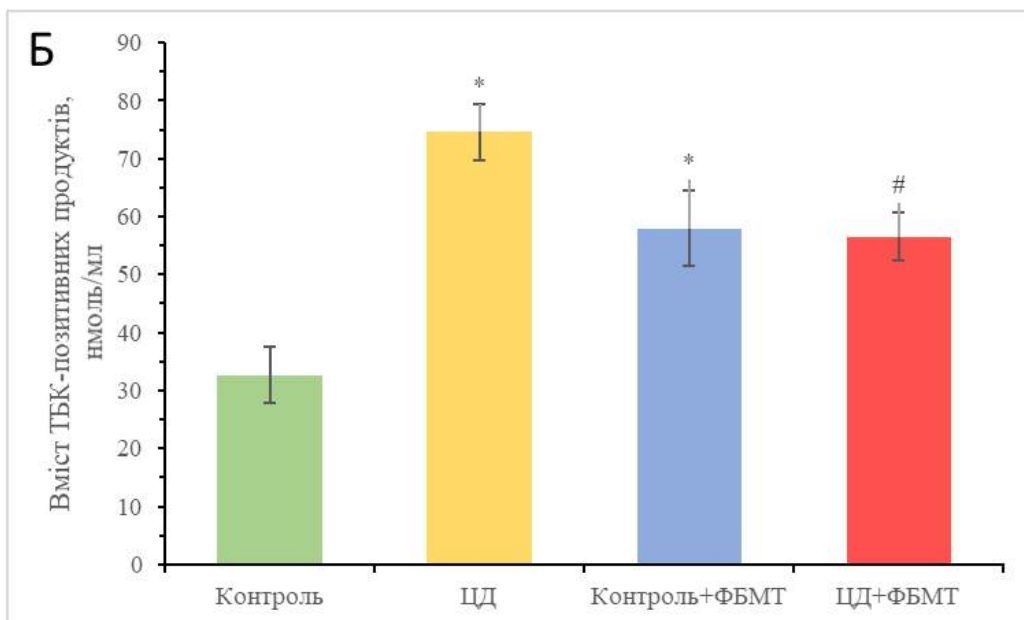
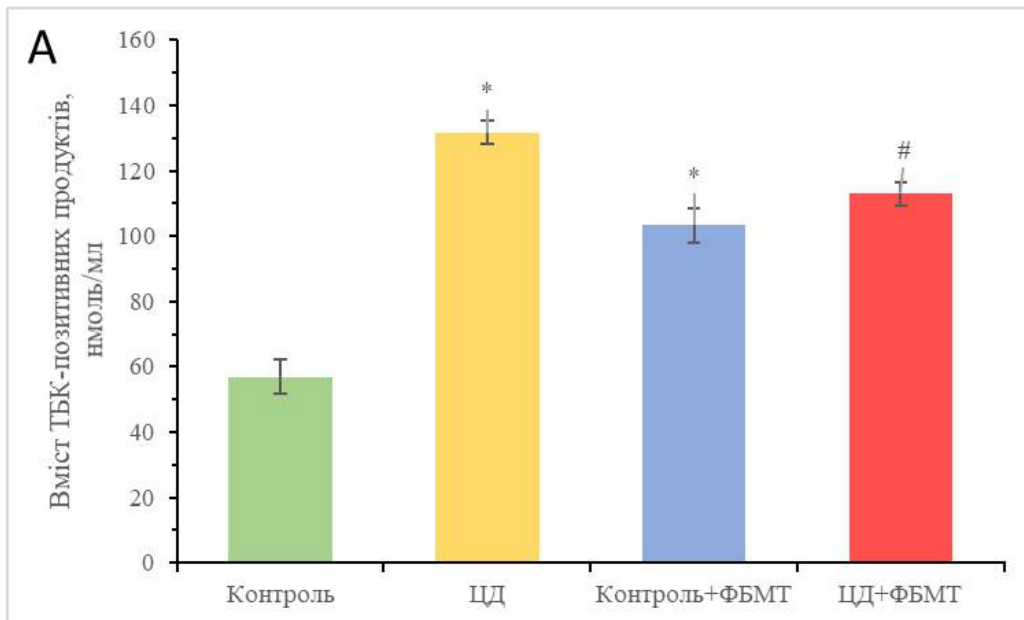
Як висновок, можна сказати, що підвищення кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну, зниження кількості ретикулоцитів та відсутні зміни у середньому вмісті гемоглобіну в 1 еритроциті, а також підвищення тривалості гемолізу з одночасним зниженням кількості гемолізованих еритроцитів за умов

ЦД і дії ФБМТ свідчить про її нормалізуючий вплив на роботу системи еритроноу, яка дуже виснажується при ЦД. Також дані кривих гемолізу свідчать про нормалізацію стану мембран зрілих еритроцитів, а дані дослідження спорідненості гемоглобіну до кисню – про нормалізацію кисень-транспортної функції крові та запобіганню гіпоксії. Вважаємо, що ці ефекти ФБМТ можуть опосередковуватися протопорфірином, оскільки ми виявили підвищення його вмісту у щурів з ЦД за дії опромінення. Окрім того, дія ФБМТ може бути опосередкована впливом на про-/антиоксидантний баланс клітин та на зниження рівня глюкози у крові.

Представлені вище результати були опубліковані у статтях [3; 66]

3.2. Вплив ФБМТ на розвиток оксидативно-нітративного стресу

Важливим показником розвитку оксидативного стресу загалом та темпів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) зокрема, є вміст ТБК-позитивних продуктів. Встановлено, що за умов ЦД він збільшувався як у плазмі крові, так і в гемолізатах еритроцитів, що свідчить про розвиток оксидативного стресу (Рис. 11). Також за умов ЦД вміст ТБК-позитивних продуктів зростав і у лейкоцитах крові щурів у 1,5 раза порівняно з контролем. За дії низькоінтенсивного світлового випромінювання ми отримали різноспрямовані результати в контролі та за умов ЦД. У контрольній групі тварин спостерігалось збільшення вмісту ТБК-ПП як у плазмі крові, так і в гемолізатах в 1,8 раза, а за опромінення щурів з ЦД він знижувався в плазмі крові та в гемолізатах еритроцитів (в 1,2 та 1,3 раза відповідно) порівняно зі значеннями у неопромінених тварин. У лейкоцитах достовірних змін у вмісті цього показника у здорових тварин, який опромінювали не виявлено, однак у тварин з ЦД за щоденного впливу ФБМТ відбувалося зниження цього показника у 1,4 раза порівняно зі значенням у неопромінених тварин.



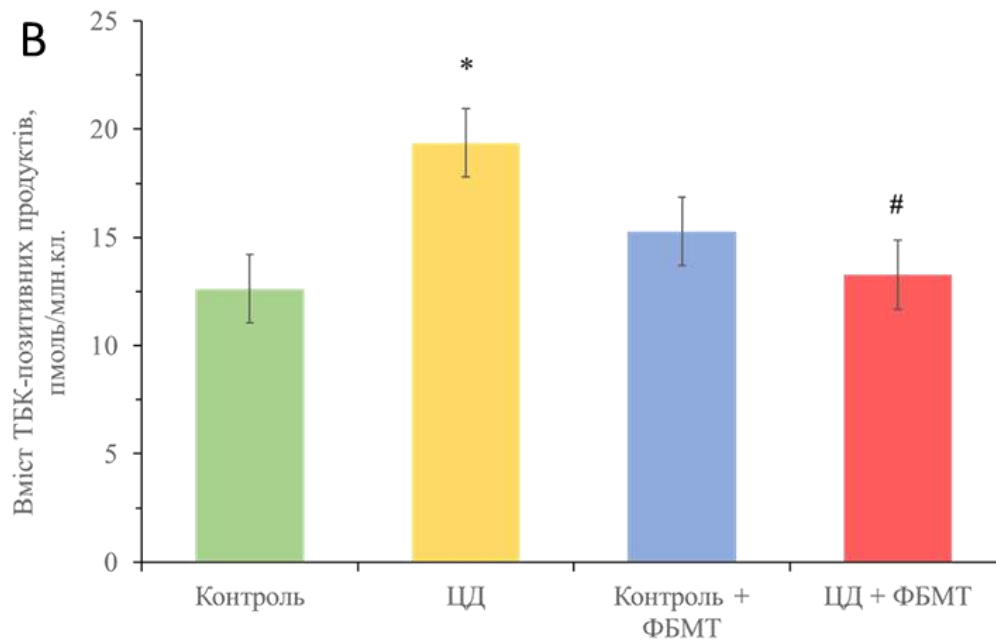


Рис. 11. Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові (А), у гемолізатах еритроцитів (Б) та лізатах лейкоцитів (В) за досліджуваних умов.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Вміст АФО у лейкоцитах (зокрема нейтрофілах) повинен знаходитися у чіткому гомеостазі, адже процес їх синтезу відіграє важливу роль у фагоцитарному знешкодженні патогенних бактерій. Ми виявили, що за умов ЦД відбувається достовірне підвищення вмісту АФО у лейкоцитах у 1,18 раза. Опромінення здорових тварин також призводить до підвищення рівня цього показника порівняно із неопроміненими тваринами у 1,15 раза. За дії ФБМТ при ЦД не відбувалося достовірних змін у вмісті АФО порівняно із неопроміненими тваринами з ЦД.

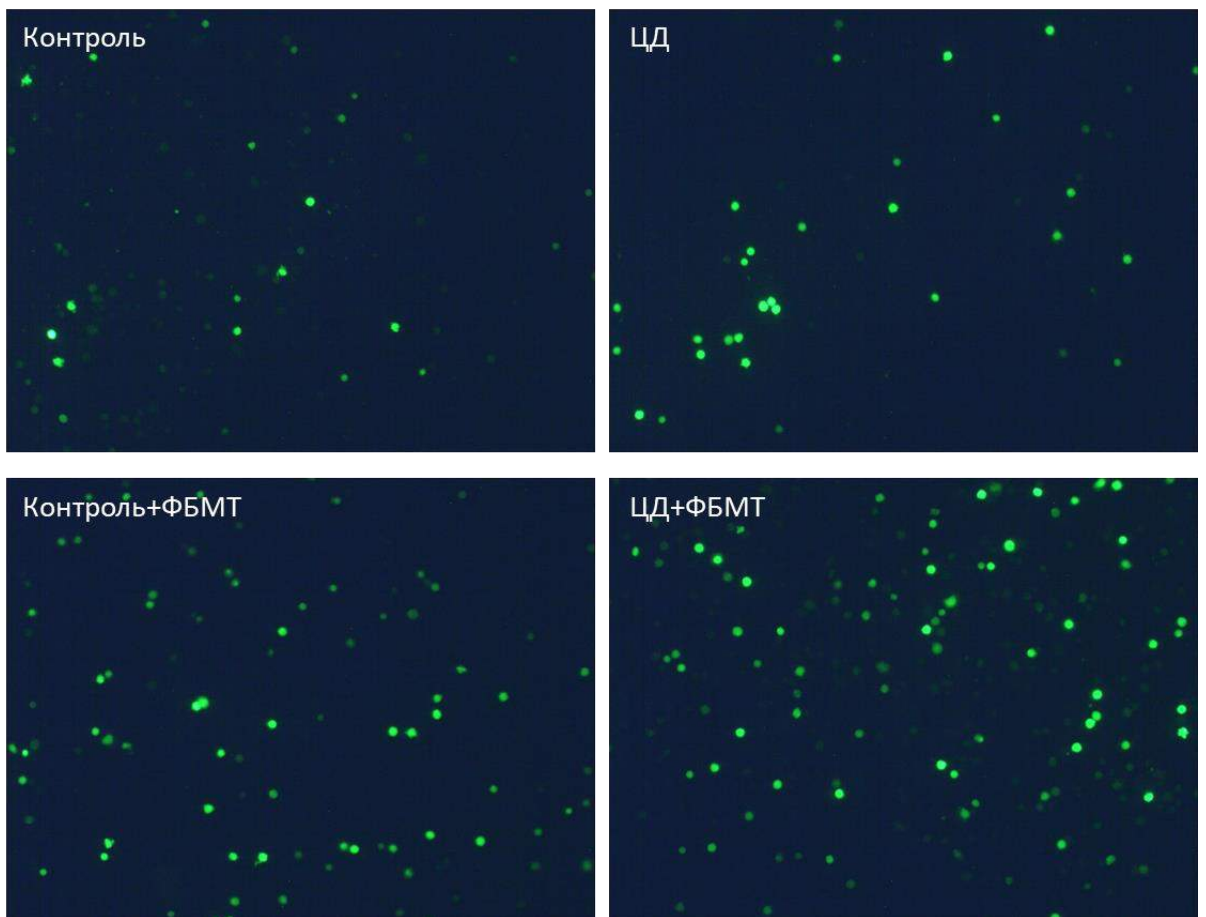
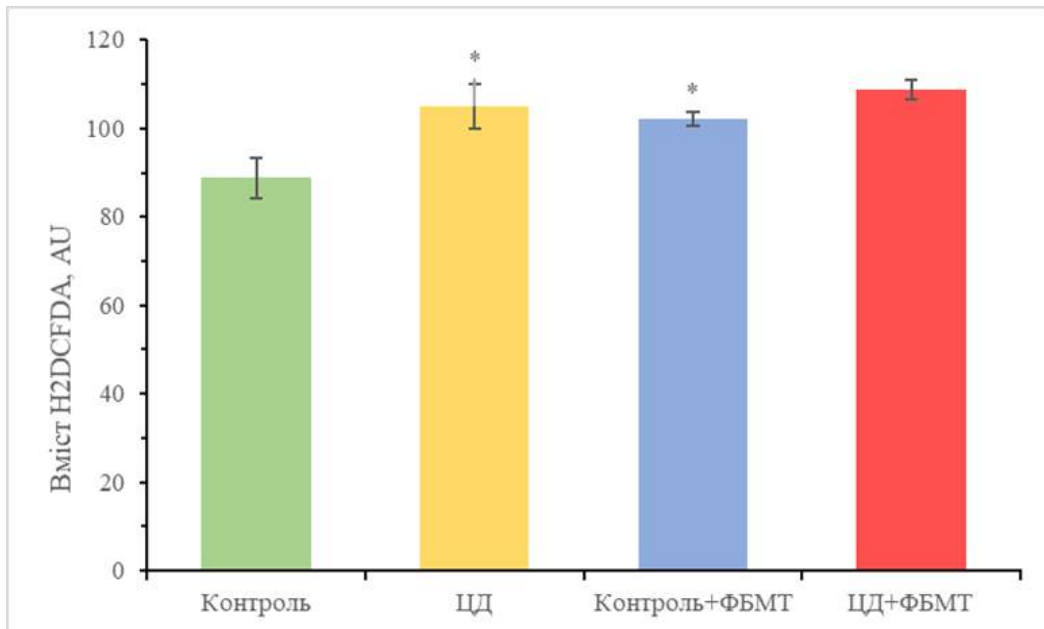


Рис. 12. Інтенсивність флуоресценції H2DCFDA у лейкоцитах щурів за досліджуваних умов.

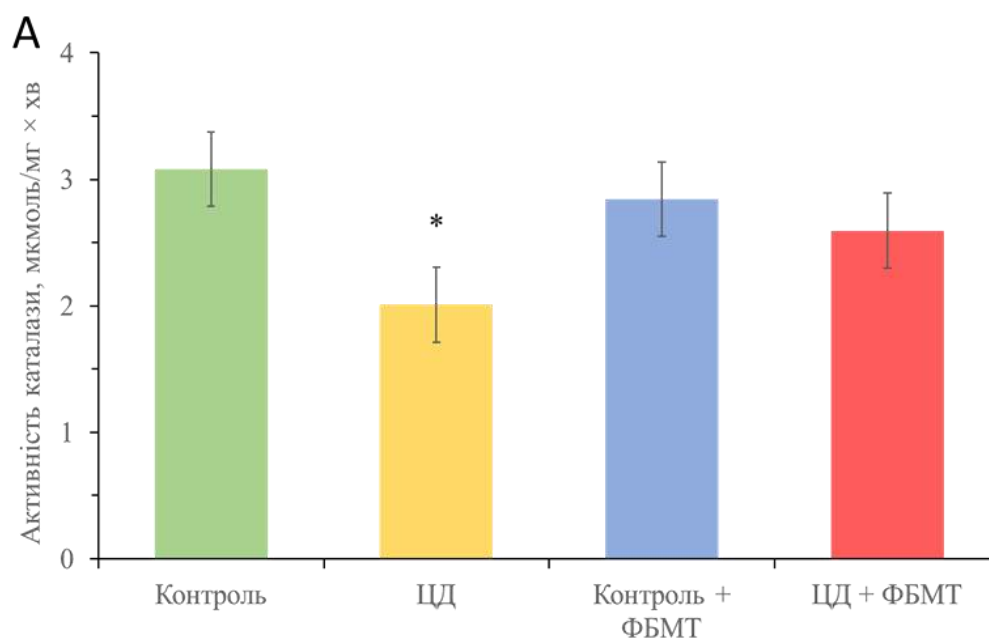
* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Відсутність змін у вмісті АФО за дії ФБМТ при ЦД на фоні зниження вмісту ТБК-пп у лейкоцитах свідчить про те, що ФБМТ не впливає напряму на

зниження кількості АФО, а навпаки, дещо підвищує їхню кількість (збільшення рівня АФО у здорових тварин після опромінення). Однак, ФБМТ, можливо, здатна впливати на ферментну систему антиоксидантного захисту клітини.

Для перевірки можливості такого ефекту ФБМТ ми вирішили дослідити активність ферментів АОС захисту. У результаті проведених досліджень виявлено, що у лізатах лейкоцитів щурів з ЦД відбувається зниження активності каталази та СОД у 1,5 раза та 1,7 раза, відповідно, порівняно з контролем. За умов опромінення тварин з ЦД не виявлено достовірного підвищення активності каталази, натомість активність СОД підвищується у 1,3 раза порівняно із таким же показником у неопромінених діабетичних тварин.



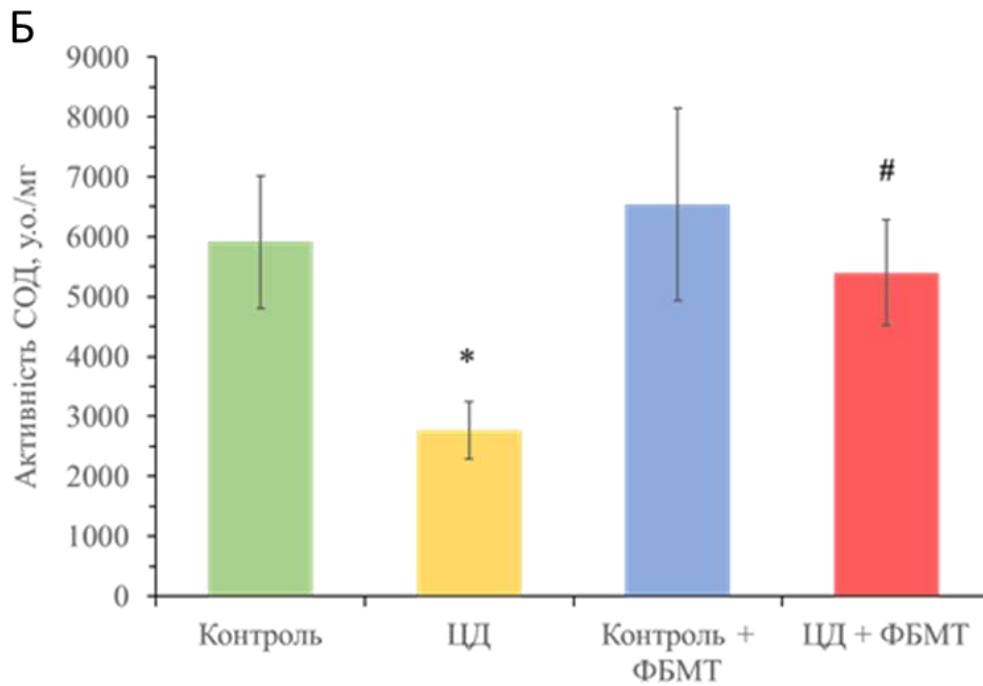


Рис. 13. Активність каталази у лізатах лейкоцитів, мкмоль/мг \times хв (А) і активність СОД (супероксиддисмутази) у лізатах лейкоцитів, у.о/мг. (Б).

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

На наступному етапі досліджень проаналізовано вплив ФБМТ на вміст окисно модифікованих білків (ОМБ) у лізатах лейкоцитів периферичної крові здорових щурів та щурів з ЦД. Ми виявили, що за умов ЦД вміст ОМБ як нейтрального, так і основного характеру зростає у 2,4 раза та 2,0 рази, відповідно, порівняно з контролем. Опромінення тварин із ЦД сприяє зниженню вмісту ОМБ (у 2,3 раза для ОМБ₃₇₀ та 2,1 раза для ОМБ₄₃₀) у лейкоцитах крові порівняно із цими ж показниками у неопромінених діабетичних тварин. Слід зазначити, що опромінення здорових щурів спричиняє різке підвищення ОМБ₃₇₀ (у 2,9 раза) та ОМБ₄₃₀ (у 2,4 раза) у порівнянні зі значеннями у неопромінених тварин.

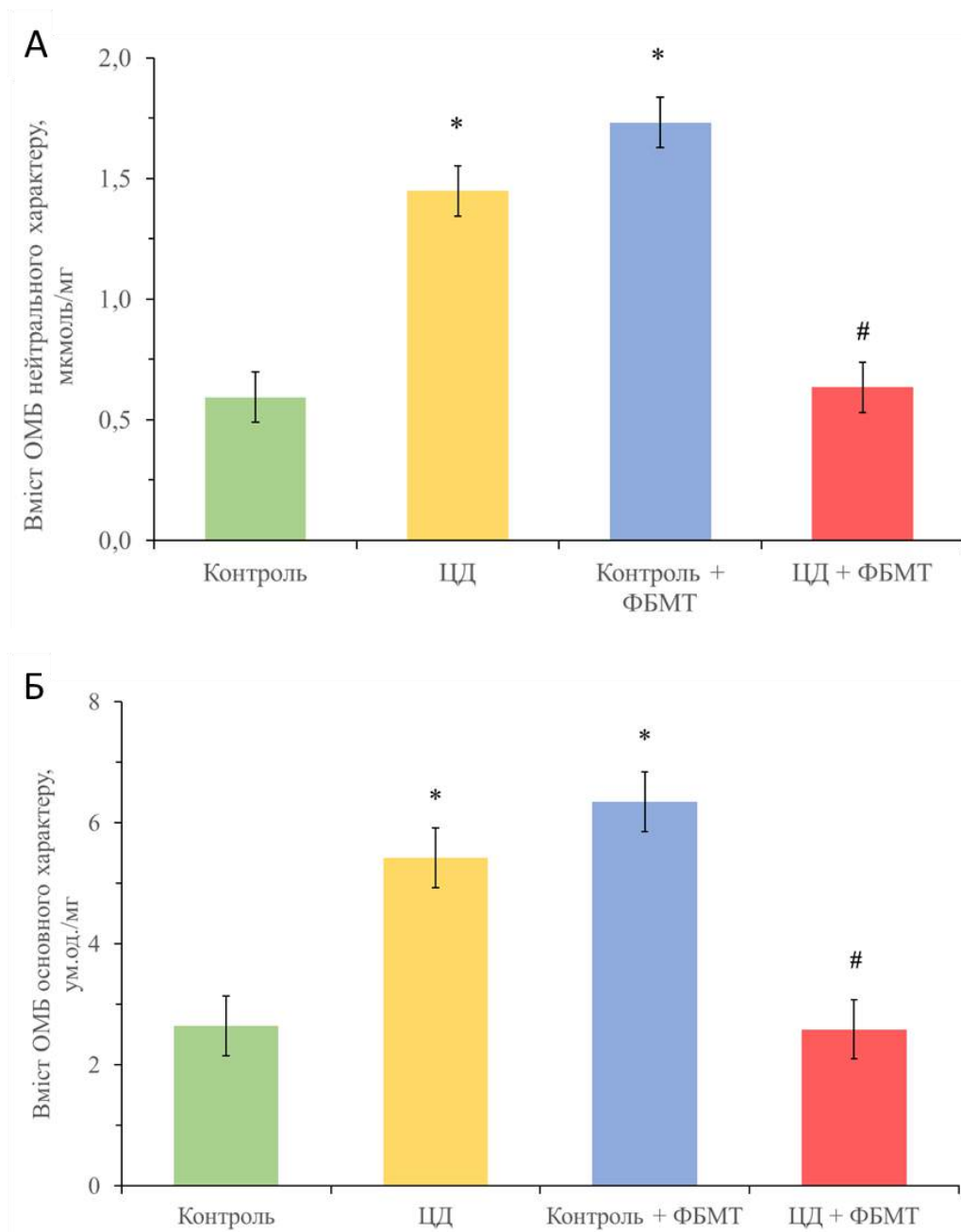


Рис. 14. Вміст ОМБ нейтрального (А) та основного (Б) характеру у лізатах лейкоцитів.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Важливими показниками розвитку оксидативного стресу у клітинах організму є вміст AOPPs та AGEs.

В результаті наших досліджень встановлено, що у лізатах лейкоцитів крові щурів за умов ЦД вміст AOPPs знижується у 1,4 раза, а вміст AGEs – у 1,8 раза порівняно з контролем. У разі впливу ФБМТ у тварин з ЦД спостерігається

тенденція до нормалізації вмісту цих показників. У плазмі крові щурів з ЦД вміст AOPPs підвищувався у 1,7 раза, а вміст AGEs – у 1,5 раза порівняно з контролем. За щоденного опромінення тварин з ЦД відбувалось зниження AOPPs у 1,4 раза, а AGEs у 1,9 раза порівняно зі значеннями у неопромінених діабетичних тварин.

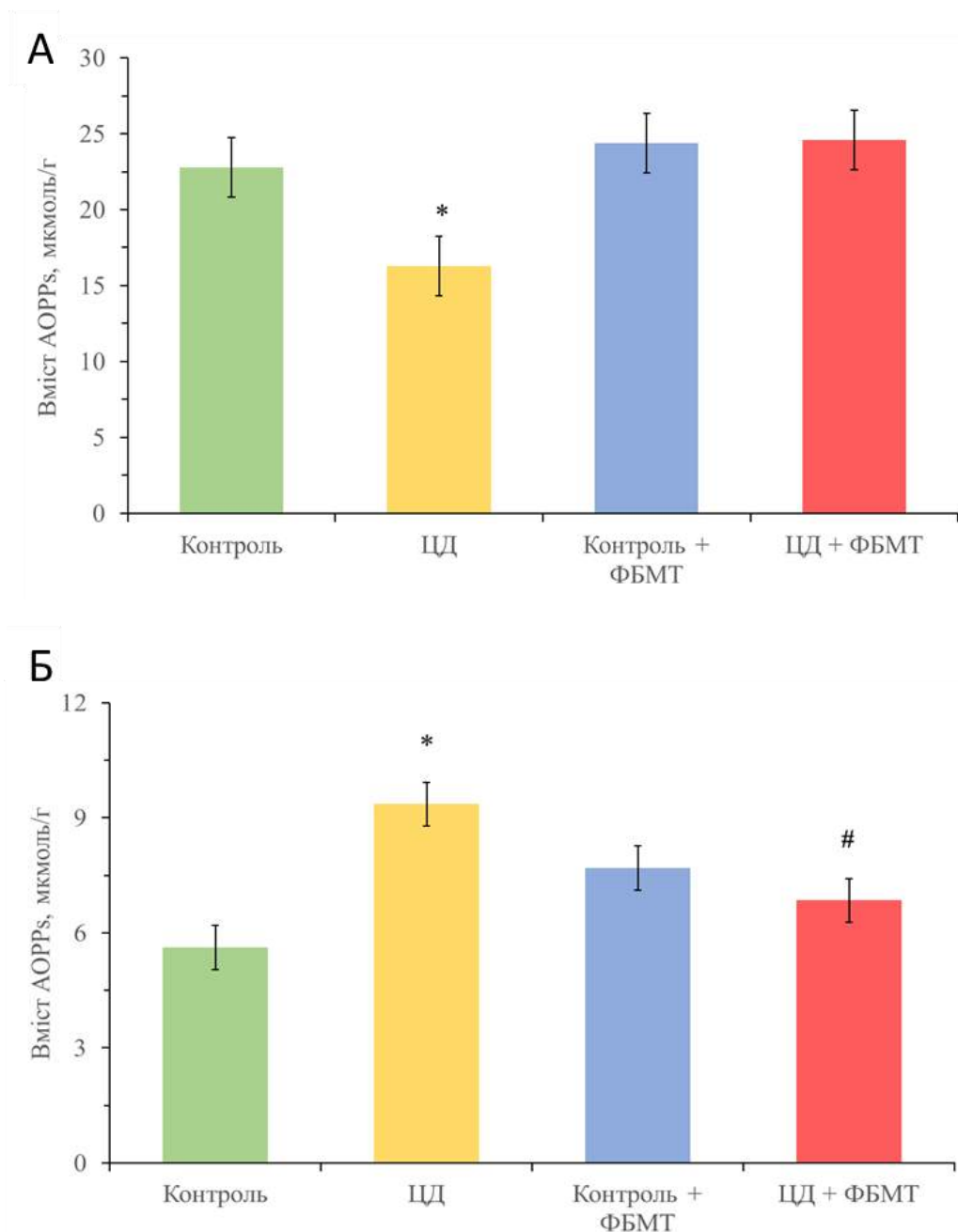


Рис. 15. Вміст AOPPs (Advanced oxidation protein products) у лізатах лейкоцитів (А) та плазмі крові (Б)

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

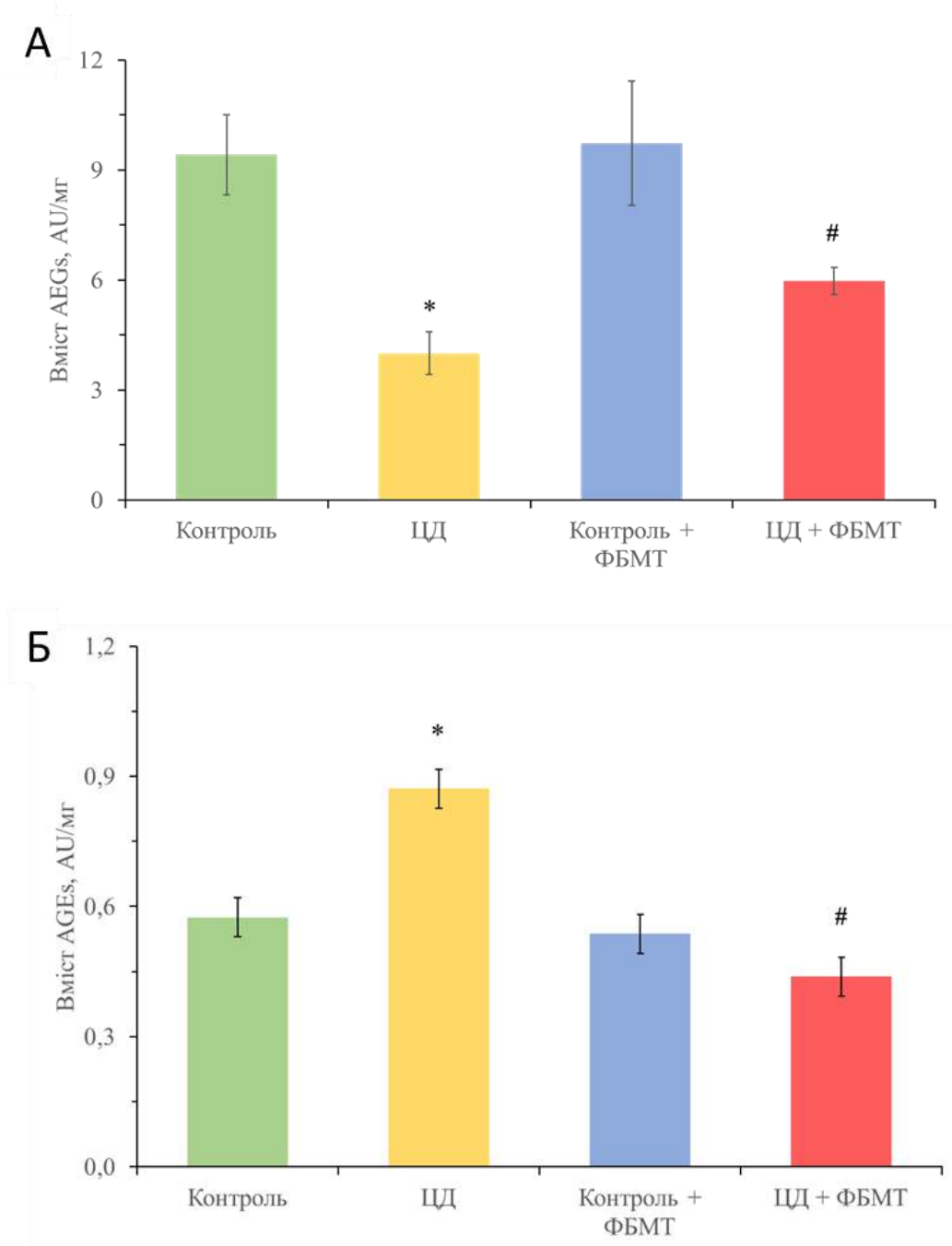


Рис. 16. Вміст AGEs (Advanced glycation end products) у лізатах лейкоцитів (А) та плазмі крові (Б).

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

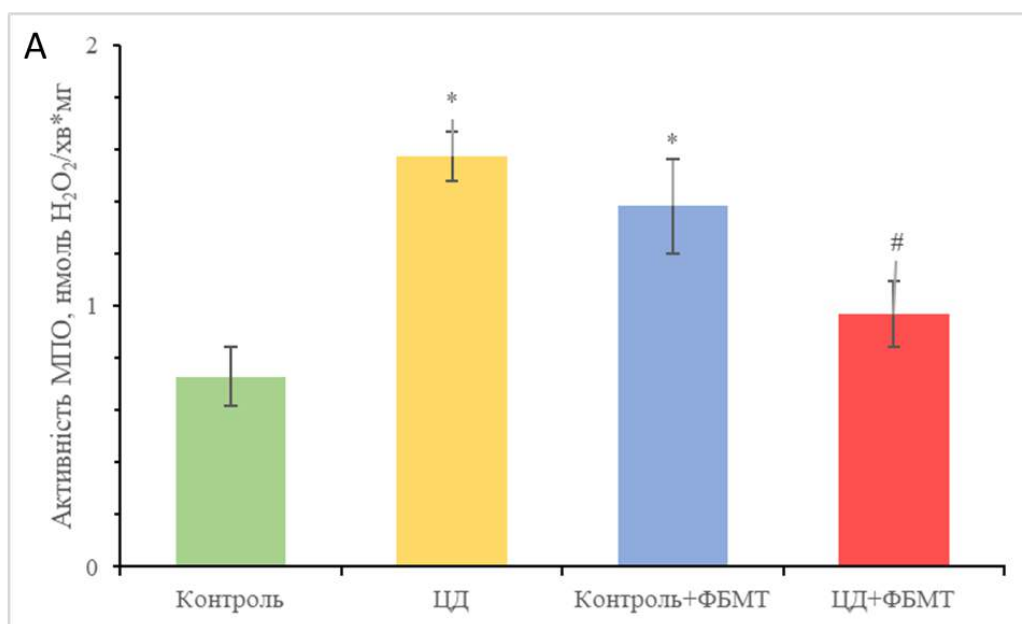
– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Хоча точна структура АОРРs не є повністю зрозумілою, відомо, що це група дитирозин-, пентозидин- та карбоніл-вмісних білкових продуктів, що генеруються під час реакції білків плазми з НОС1 і хлорамінами. Також варто зауважити, що збільшення вивільнення кисню з молекули гемоглобіну –

частково пояснює тенденцію до збільшення AORPs при ЦД+ФБМТ та збільшення AGEs при ЦД+ФБМТ, та відсутність змін у кількості АФО у лейкоцитах при ЦД+ФБМТ (разом з підвищенням активності цитохром с оксидази, про що свідчить зростання вмісту АТФ).

Одним із основних продуцентів АФО у лейкоцитах є фермент мієлопероксидаза, котра відіграє важливу роль у процесі респіраторного вибуху у нейтрофілів. Її функція полягає у синтезі гіпохлориту (НОСІ) з пероксиду водню та аніона хлору. Отже, має існувати чіткий взаємозв'язок між рівнем AORPs та активністю мієлопероксидази.

Ми виявили, що при ЦД у плазмі крові підвищується активність мієлопероксидази у 2,16 раза. Опромінення здорових тварин також сприяє підвищенню активності цього ферменту у 1,9 раза порівняно із неопроміненими тваринами. Однак, опромінення тварин з ЦД спричиняло зниження цього показника у 1,63 раза, порівняно із неопроміненими тваринами з ЦД.



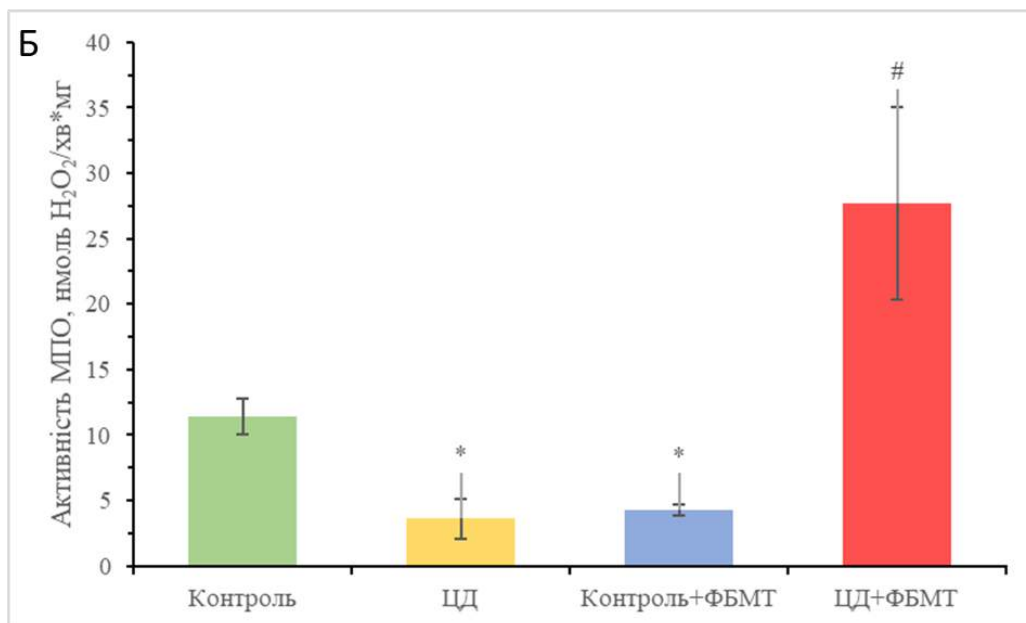


Рис. 17. Активність мієлопероксидази у плазмі крові (А) та у лізатах лейкоцитів (Б).

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Протилежна ситуація спостерігається у лейкоцитах. За умов ЦД ми виявили зниження активності мієлопероксидази у 3,18 раза. Опромінення здорових тварин також супроводжувалося зниженням цього показника у 2,69 раза порівняно із неопроміненими тваринами. Однак за дії ФБМТ при ЦД ми виявили підвищення активності мієлопероксидази у 7,7 раза порівняно із неопроміненими тваринами з ЦД.

Такі результати можна пояснити зниженим вмістом кінцевих продуктів глікації у лейкоцитах за умов ЦД, адже існують дані, що AGEs здатні стимулювати продукцію МПО у нейтрофілах. Високе значення активності МПО у лейкоцитах при дії ФБМТ за умов ЦД можна пояснити комбінованою дією збільшеної концентрації AGEs та прямої активації ферменту за дії світла, оскільки до складу МПО входить гем.

Кінцеві продукти глікації (білки змінені взаємодією з гліоксалем, метилгліоксалем та деоксиглюкозоном) здатні запускати продукцію АФО, активувати апоптоз та фрагментацію ДНК за рахунок взаємодії із своїм специфічним рецептором RAGE.

Сформувавшись, AGE можуть зв'язуватися з різними рецепторами AGE (AGER1, AGE-R2, AGE-R 3 і RAGE) або аномально взаємодіяти з компонентами позаклітинного матриксу для сприяння генерації АФО. Крім білків, ліпіди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та деякі компоненти позаклітинного матриксу можуть бути модифіковані в AGE. Формування попередників AGE було в першу чергу пов'язане з гіперглікемією. Наприклад, накопичення глюкози може призвести до її автоокиснення, в результаті чого утворюється гліоксаль. Зв'язування AGEs з рецепторами сприяє розвитку оксидативного стресу, зокрема через шлях РКС.

За допомогою вестерн-блот аналізу ми виявили, що у плазмі крові за умов ЦД спостерігається підвищення вмісту RAGE у 1,38 раза, однак за дії ФБМТ при ЦД відбувається зменшення цього показника у 1,25 раза порівняно із неопроміненими тваринами з ЦД. Між RAGE і AGE існує позитивний зв'язок, коли підвищення одного показника, спричиняє зростання іншого. Отримані нами дані свідчать, що ФБМТ завдяки своїй антиоксидантній дії здатна запобігти такому процесу нагромадження кінцевих продуктів глікації та розвитку оксидативного стресу.

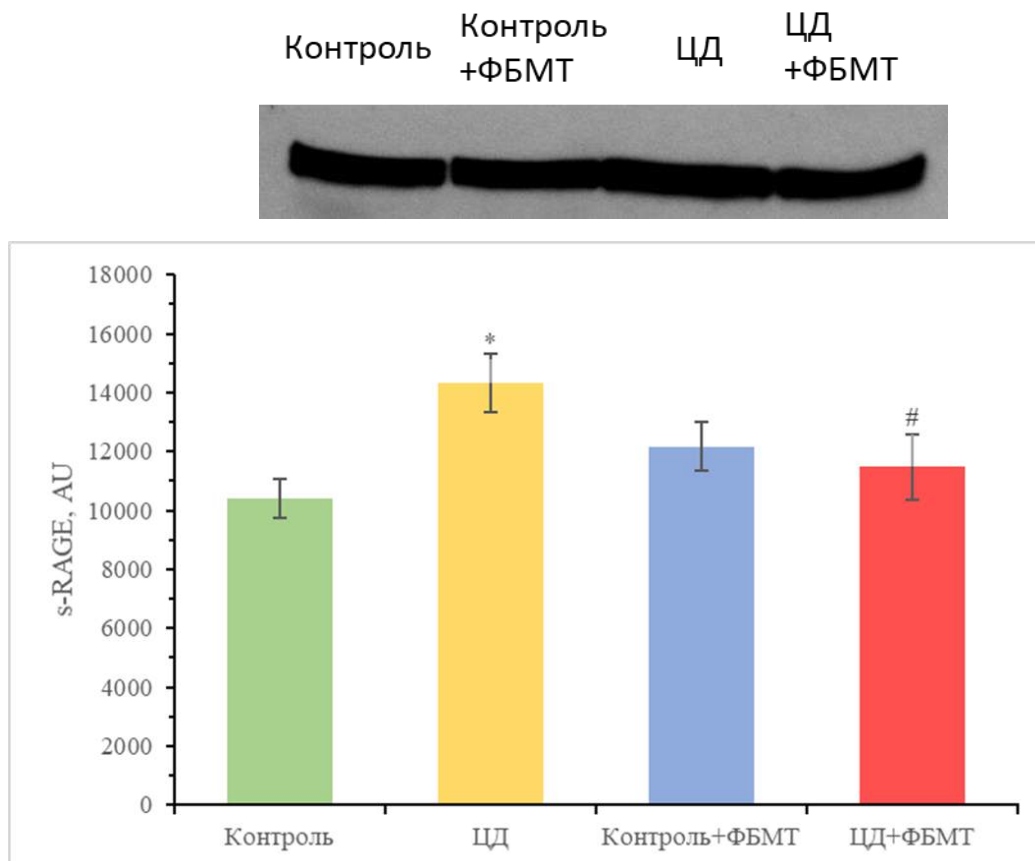


Рис. 18. Результати Вестерн-блот аналізу s-RAGE у плазмі крові щурів за досліджуваних умов.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Окрім оксидативної ланки, ми вирішили звернути увагу на нітративну ланку системи оксидативно-нітративного стресу, а саме активність NO-синтази та вмісту нітритів.

У результаті проведених нами досліджень ми встановили, що активність сумарної NOS у лейкоцитах щурів з ЕЦД була у 2,48 раза вищою у порівнянні з групою здорових тварин. Натомість, ФБМТ викликала зниження активності сумарної NOS у лейкоцитах опромінених щурів з ЕЦД у 2,5 раза у порівнянні із неопроміненими щурами з ЕЦД (Рис. 19.).

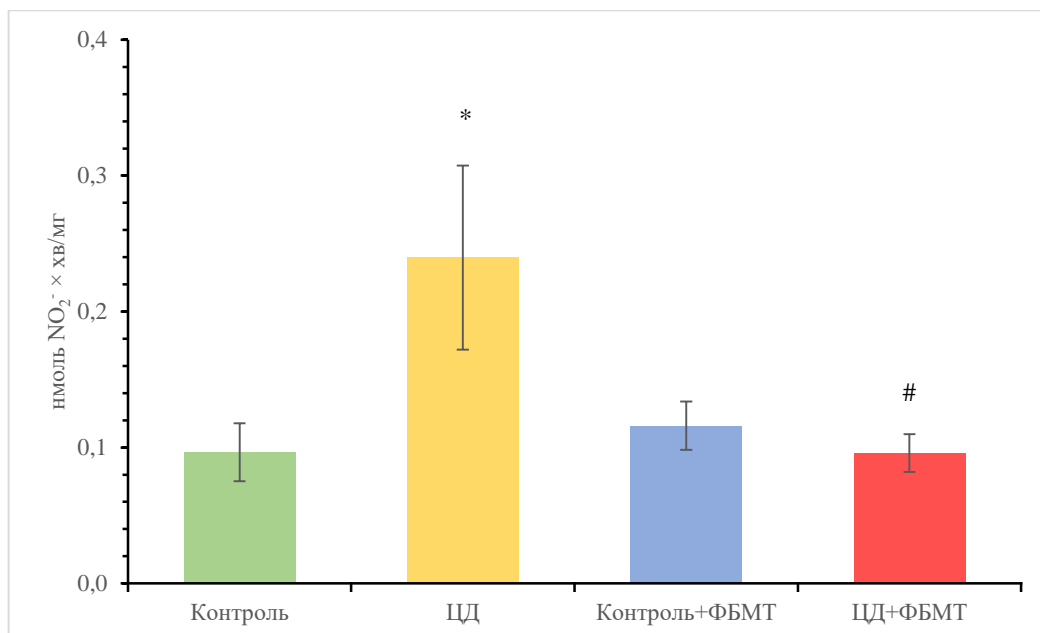


Рис. 19. Сумарна активність NOS у лізатах лейкоцитів, нмоль NO₂⁻ × хв/мг білка.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, P < 0,05;

– різниця вірогідна порівняно з ЕЦД, P < 0,05.

Окрім того, ми виявили підвищення активності індукцибельної NOS (iNOS) у лейкоцитах тварин з ЕЦД у 2,02 раза порівняно з контрольною групою. Також за дії ФБМТ на здорових тварин ми спостерігали підвищення активності iNOS у лейкоцитах у 1,45 раза. ФБМТ не мала достовірного впливу на активність iNOS у лейкоцитах щурів з ЕЦД, проте спостерігалася тенденція до зниження цього показника (Рис. 20.).

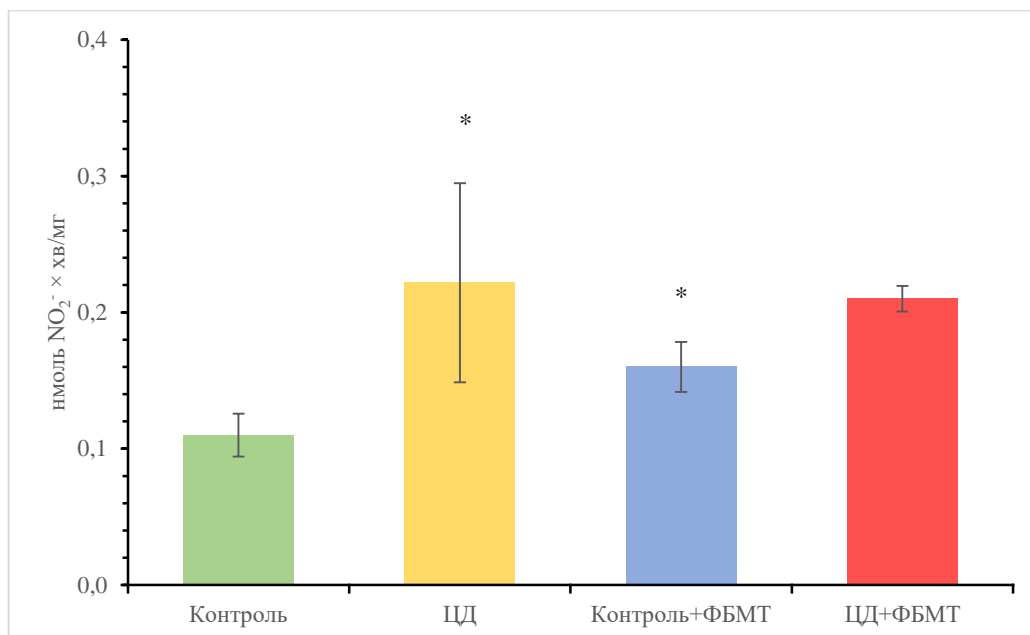


Рис. 20. Активність iNOS у лізатах лейкоцитів, NO₂⁻ × хв/мг білка.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, P < 0,05;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, P < 0,05.

Під час ЦД розвивається оксидативно-нітративний стрес, одним з наслідків якого стає посилення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мембранах клітин і мітохондрій, що призводить до пригнічення активного транспорту іонів Ca²⁺, а також до збільшення проникності мембран для Ca²⁺ [6]. Крім того, відомо, що хронічна гіперглікемія призводить до збільшення експресії ендотеліальної NOS [1]. Іони Ca²⁺ стають причиною активації кальцій-кальмодуліном ендотеліальної та нейрональної форм NOS, шляхом приєднання до ділянки довжиною 30 амінокислот, що з'єднує оксигеназний та редуктазний домени субодиниць [123]. Однією з причин зменшення активності сумарної NOS після опромінення може стати збільшення активності ферментів антиоксидантного захисту, у результаті чого знижується утворення супероксидного аніон-радикалу (O²⁻) та, як наслідок, зменшується ПОЛ. Послаблення ПОЛ призводить до зменшення проникності мембран для іонів Ca²⁺ та відновленню їх активного транспорту в ЕПР та мітохондріях. Іншою причиною може бути втрата конкуренції за субстрат (L-аргінін) з iNOS, активність якої збільшується внаслідок ФБМТ.

Як було зазначено вище, розвиток оксидативно-нітративного стресу стає причиною збільшення концентрації іонів Ca^{2+} у цитоплазмі. Іони Ca^{2+} активують внутрішньоклітинні процеси, одним з яких є збирання NADPH-оксидазного комплексу на мембрані та, як наслідок, відбувається підвищення утворення O_2^- , що стає причиною посиленого біосинтезу NO і NOS, а також посиленого ПОЛ, що веде до почергового збільшення проникності мембран для Ca^{2+} [14]. Оксид азоту, що утворюється в мітохондріях, може пригнічувати клітинне дихання шляхом зв'язування з цитохром с-оксидазою і витісненням кисню. Відомо, що ФБМТ може викликати вивільнення NO з цитохром с-оксидази і, таким чином, відновлювати мітохондріальне дихання [38].

Наявність NO-синтазного механізму забезпечує ендогенний синтез NO, який у кінцевому результаті окиснюється до нітритів та нітратів. Таким чином збільшення активності сумарної NOS та іNOS у тварин з ЦД, а також у опроміненій контрольній групі щурів, може стати причиною підвищення вмісту нітритів у лейкоцитах.

Справді, ми виявили зростання вмісту NO_2^- у лізатах лейкоцитів щурів з ЦД у 1,92 раза порівняно з контролем. За дії ФБМТ вміст NO_2^- у щурів з ЦД достовірно знижувався у 1,47 раза порівняно з неопроміненими тваринами з ЦД (Рис. 21.).

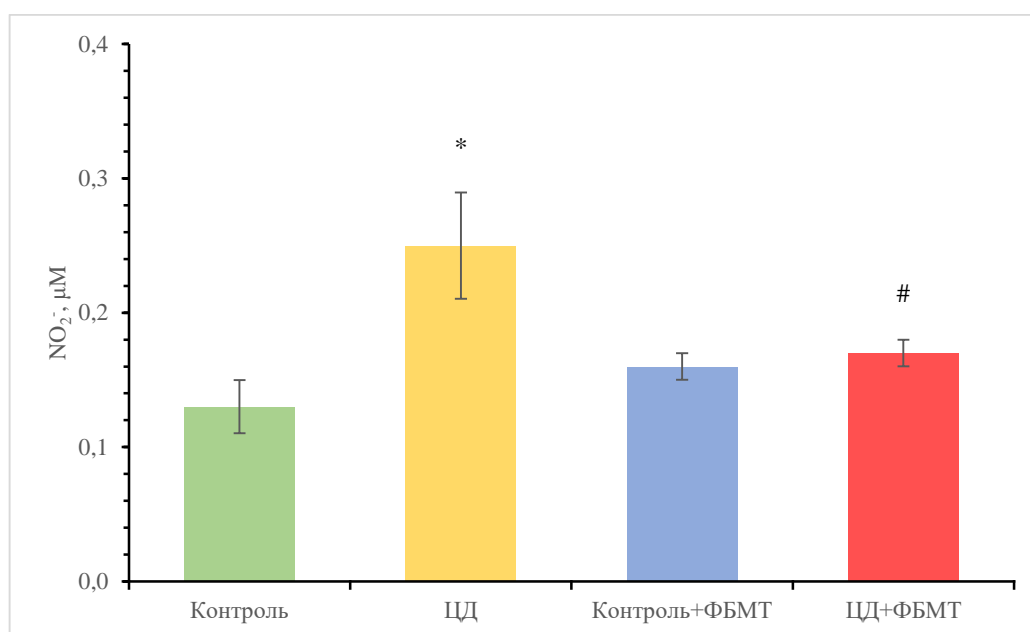


Рис. 21. Вміст NO_2^- у лізатах лейкоцитів, μM .

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Відомо, що утворення АФО у лейкоцитах супроводжується збільшенням споживання кисню, який необхідний для подальшого перетворення нітритів у нітрати. У той же час взаємодія NO з $\cdot\text{O}_2^-$ призводить до утворення особливо токсичної сполуки – пероксинітриту, одним з продуктів розпаду якого є нітрит-іон, а також гідроксильний радикал [92]. Також відомо, що в умовах дефіциту кисню ендотеліальна NOS здатна проявляти нітритредуктазну активність генеруючи NO [2, 4]. Як зазначалося вище, наслідком впливу ФБМТ на щурів з ЦД стає збільшення активності таких ферментів, як каталаза та супероксиддисмутаза, у результаті чого зменшується утворення пероксинітриту і $\cdot\text{O}_2^-$, а також збільшується концентрація O_2 (про що свідчать результати, вказані на Рис.10 та у Табл. 1), що може бути причиною зменшення вмісту NO та NO_2^- .

Підсумки до розділу:

Досліджено вплив ФБМТ на розвиток оксидативно-нітративного стресу у організмі щурів за умов ЕЦД. Показано відсутність прямого впливу ФБМТ на вміст АФО у лейкоцитах щурів з ЕЦД. Показано позитивний вплив ФБМТ на окремі показники розвитку оксидативного стресу у крові та лейкоцитах щурів з ЕЦД. Виявлено зниження вмісту AGEs та AOPPs у лейкоцитах щурів за ЕЦД. Виявлено різноспрямований вплив ФБМТ на активність МПО у плазмі крові та лейкоцитах щурів з ЕЦД. Показано позитивний вплив ФБМТ на нітративну ланку системи оксидативно-нітративного стресу.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [3; 66-68]

3.3. Вплив ФБМТ на глікемічний профіль організму та енергозабезпечення лейкоцитів щурів за ЕЦД

У результаті проведених досліджень встановлено, що за щоденного впливу ФБМТ не відбувалося достовірних змін концентрації глюкози цільної крові та

глікозильованого гемоглобіну у еритроцитах периферичної крові здорових щурів (Рис. 22-23.). Натомість у разі ЦД та опромінення концентрація глюкози знижувалась у 1,58 рази, а вміст глікозильованого гемоглобіну у 1,18 рази порівняно зі значеннями неопромінених тварин.

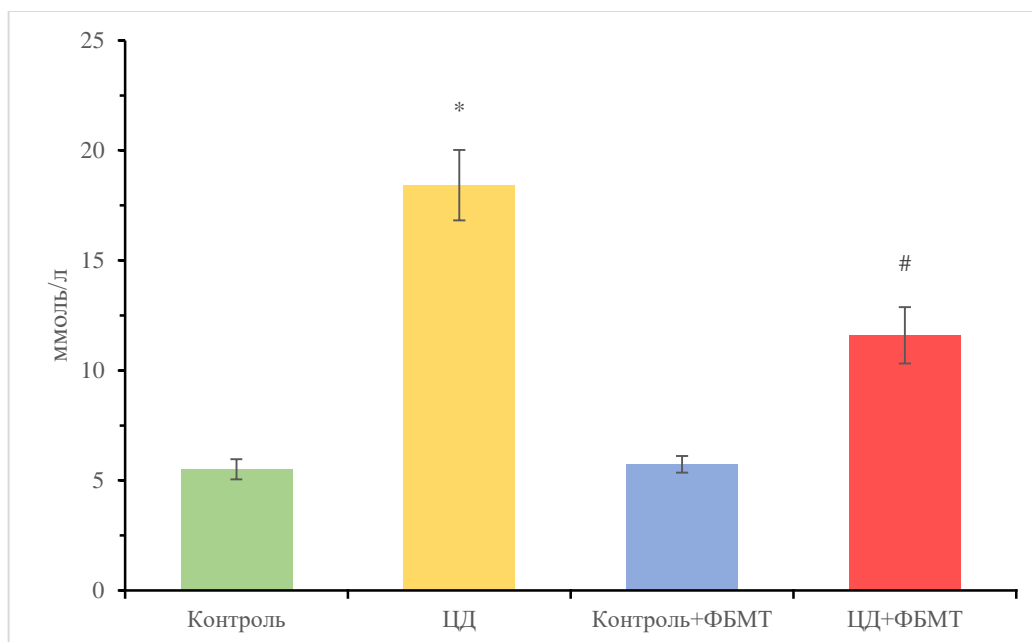


Рис. 22. Концентрація глюкози у цільній крові щурів за досліджуваних умов, ммоль/л.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

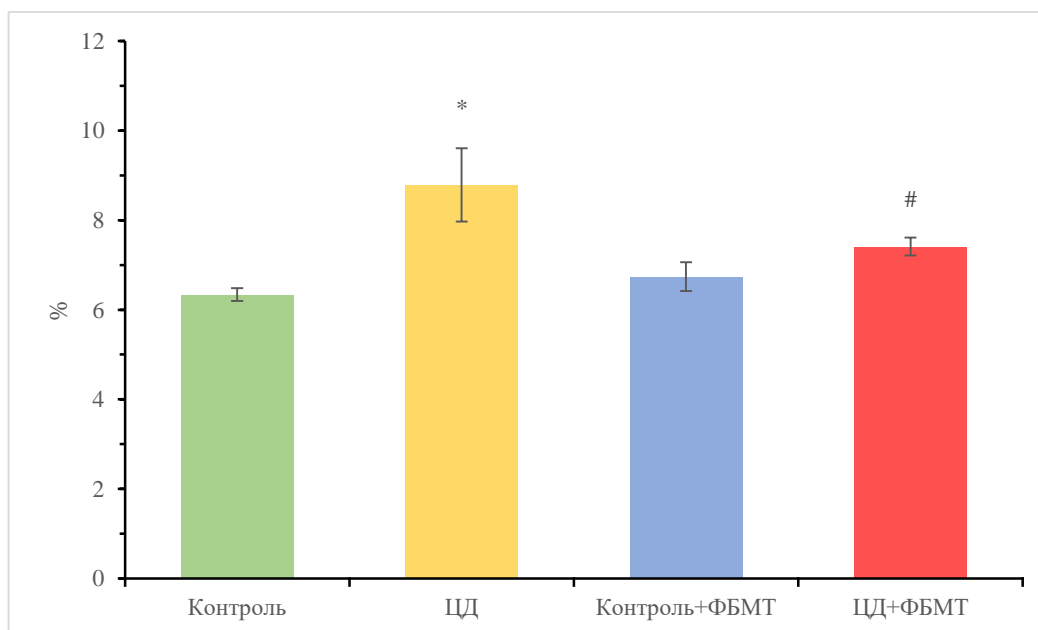


Рис. 23. Вміст глікозильованого гемоглобіну у крові щурів за досліджуваних умов, %.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Вміст глікозильованого гемоглобіну – важливий показник, який демонструє довготривалі зміни у концентрації глюкози у крові. Його зниження може свідчити про пролонгований гіпоглікемічний ефект ФБМТ, адже час життя еритроцитів щурів становить приблизно 50 днів, а 50 % глікозильованого гемоглобіну утворюються у останній чверті життя еритроцита, що співпадає із тривалістю ФБМТ у наших дослідах [61; 106].

Щоб детальніше дослідити гіпоглікемічний ефект ФБМТ, ми провели глюкозонавантажувальний тест. Ми виявили, що за умов ЦД толерантність організму до навантаження глюкозою погіршується, в такому випадку крива зміни концентрації глюкози має чіткіший пік на 30 хвилині досліду та розташована на графіку вище (рис. 24А), а площа під кривою у 2,69 раза більша, аніж у контролю (рис. 24Б). Достовірних відмінностей між контрольними та здоровими тваринами, яких опромінювали ми не виявили. Однак за умов ЦД та дії ФБМТ ми виявили покращення толерантності організму до навантаження глюкозою, зокрема крива зміни концентрації глюкози займає на графіку проміжне місце між групами контролю та діабету, а площа під кривою менша у 1,83 раза, ніж у групи ЦД.

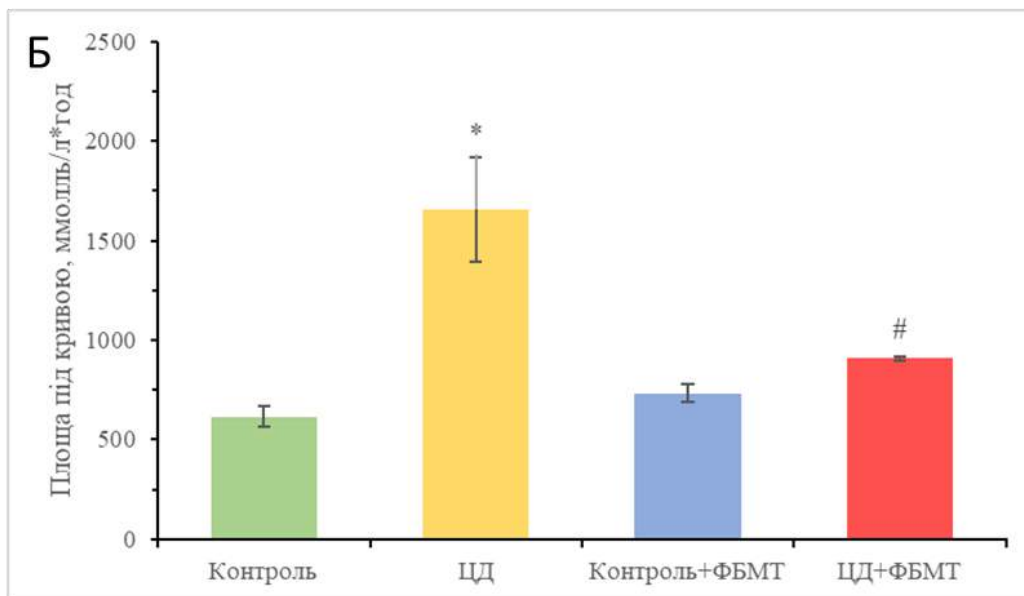
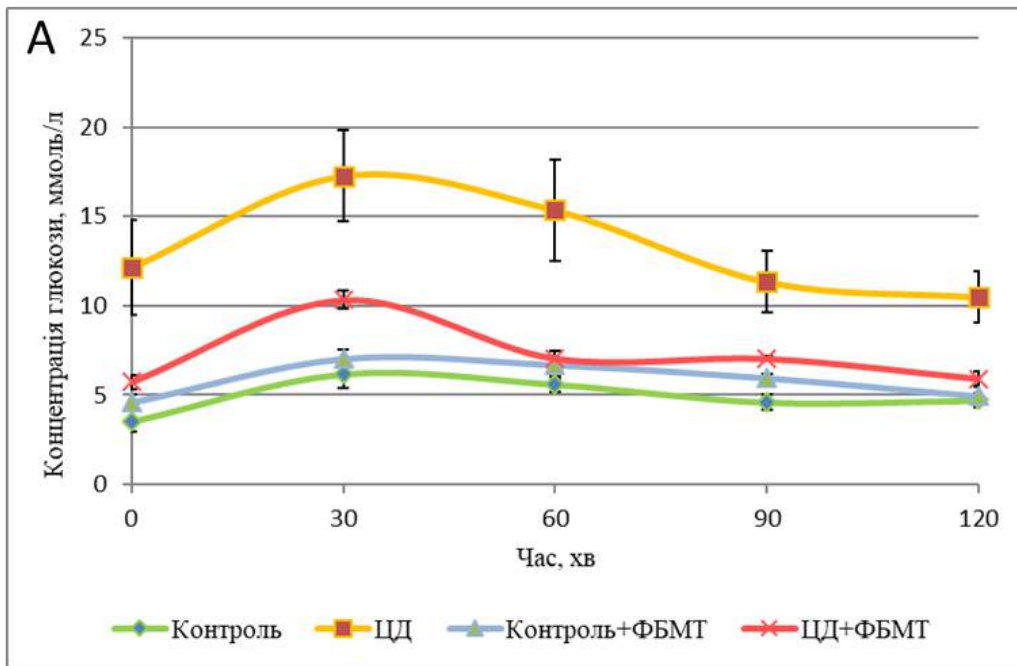


Рис. 24. Результати глюкозонавантажувального тесту: типові криві (А) та площа під кривою, ммоль/л*год (Б)

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Отже, ФБМТ позитивно впливає на глікемічний профіль організму за ЦД і проявляє цукрознижувальний ефект, однак причини такого впливу залишаються нез'ясованими. Молекулярні та біохімічні механізми гіпоглікемічної дії ФБМТ можуть залежати як від функціональної активності β -клітин підшлункової залози, так і від регуляції мереж трансдукції гормонального сигналу. Наприклад,

було виявлено, що ФБМТ здатна впливати на регенерацію β -клітин підшлункової залози шляхом індукції конформаційних змін тирозинкіназного рецептора, який є інтегральним білком плазматичної мембрани β -клітин [58]. Такі зміни активують трансдукцію внутрішньоклітинного сигналу за участю фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3-K) та протеїнкінази В (Akt1), що викликає фосфорилування та інактивацію кінази глікогенсинтази 3β (GSK3 β). Дефосфорильована GSK3 β у цитозолі клітин перебуває у комплексі із β -катеніном. Фосфорилування GSK3 β зумовлює вивільнення β -катеніну і його транслокацію у ядро, де він регулює TCF/LEF-залежну транскрипцію (TCF/LEF – T-cell factor/lymphoid enhancer binding factor), що в кінцевому результаті активує проліферацію β -клітин підшлункової залози. Крім того, інгібування GSK3 β за впливу ФБМТ знижує рівень експресії інгібітора циклінзалежної кінази p21, що також сприяє прогресії клітинного циклу [58].

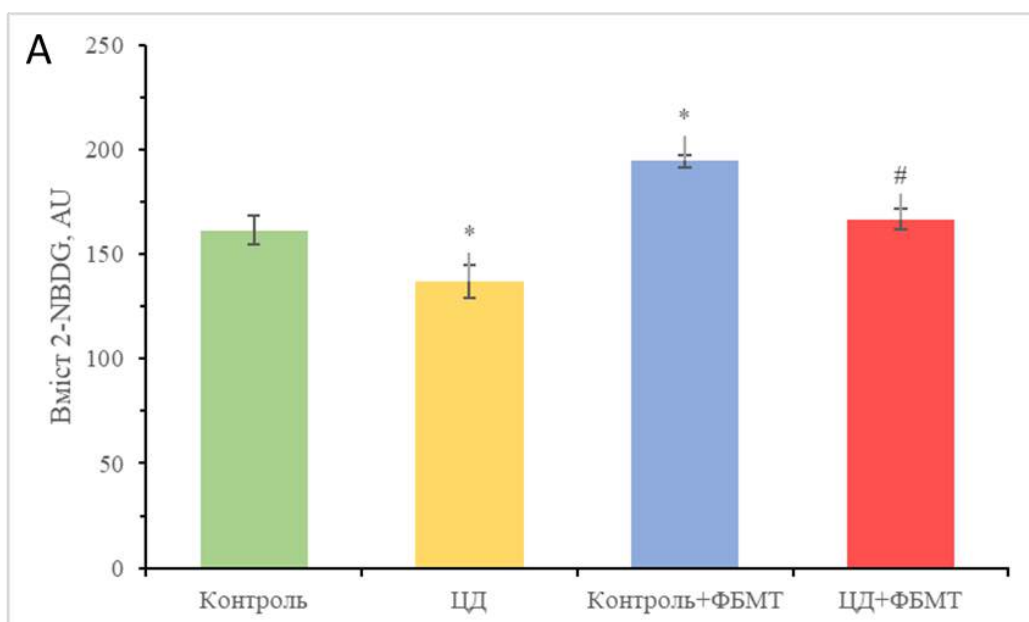
На думку Shui та співав., ФБМТ інфрачервоного діапазону спектра проявляє гіпоглікемічний ефект за рахунок зниження вмісту кортизолу у крові і, таким чином, покращує чутливість клітин до інсуліну у хворих на ЦД 2-го типу [114].

Наступним завданням, яке ми поставили перед собою, було з'ясувати яким чином відбувається зниження рівня глюкози у крові. Ми припускаємо, що за умов ФБМТ відбувається активація поглинання глюкози клітинами організму, зокрема лейкоцитами.

Лейкоцити периферичної крові – це група тісно пов'язаних між собою клітин, до яких належать нейтрофіли, моноцити, еозинофіли, базофіли та лімфоцити. Лейкоцити функціонують разом за допомогою складної системи сигнальних молекул та здатні виявляти та вбивати патогенні мікроорганізми, виявляти та видаляти мертві та застарілі клітини, чужорідний матеріал та аномальні клітини. Кожен з видів лейкоцитів можуть регулювати активність інших лейкоцитів, і підтримка гомеостазу таких взаємодій є дуже важливою, проте може порушуватися при різних патологіях.

Поглинання глюкози клітинами ми досліджували за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням барвника 2-NBDG (2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)-D-Glucose), який є флуоресцентно міченим аналогом глюкози.

Ми виявили, що за умов ЦД відбувається зниження інтенсивності поглинання глюкози лейкоцитами у 1,18 раза порівняно з контролем. За опромінення тварин з ЦД відбувається підвищення цього показника у 1,22 раза порівняно із неопроміненими тваринами з ЦД. Окрім того, при опроміненні здорових щурів також відбувається підвищення активності поглинання глюкози у 1,21 раза порівняно із неопроміненими тваринами (Рис. 25.).



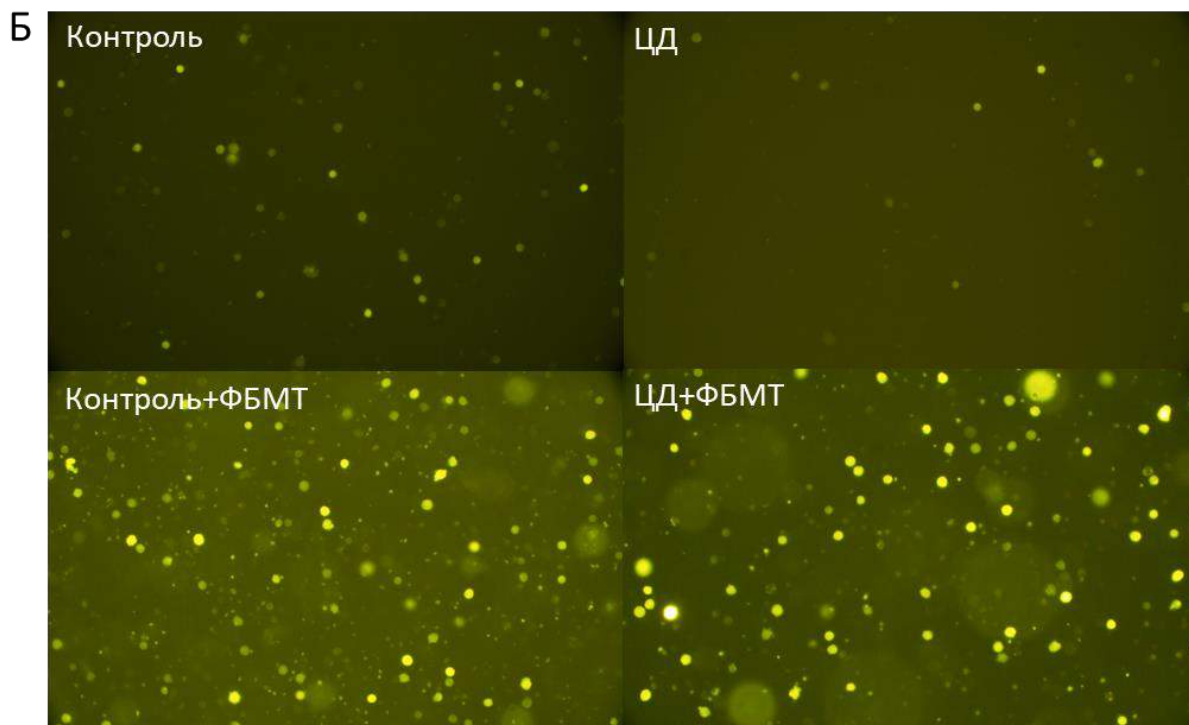


Рис. 25. Інтенсивність флуоресценції 2-NBDG у лейкоцитах щурів за досліджуваних умов, (AU) (А), мікрофотографії флуоресценції лейкоцитів за досліджуваних умов (збільшення 25,2х) (Б).

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Механізм такої дії важко пояснити, адже дослідження транспорту глюкози та активності її транспортерів у лейкоцитах малочисельні та суперечливі. Зокрема, відомо, що у лейкоцитах периферичної крові наявні такі транспортери глюкози: GLUT1, GLUT3, GLUT6, GLUT9. Відомо, що GLUT6 є низькоафінним транспортером глюкози із наразі неідентифікованим первинним фізіологічним субстратом і його функція у лейкоцитах наразі невідома (хоча припускають, що він може бути залучений в транспорті глюкози між внутрішніми компартментами клітини), а щодо GLUT9 існують дані про його наявність у лейкоцитах, однак його функцію у цих клітинах досі не з'ясовано. Таким чином, GLUT1 та GLUT3 вважаються основними транспортерами глюкози у лейкоцитах [65; 98]. Варто зауважити, що у щурів, на відміну від людей, GLUT3 експресується лише у мозку, тож GLUT1 лишається єдиною мішенню для

ФБМТ, особливо якщо врахувати, що його експресія консервативна серед ссавців [101]. Відомо, що ФБМТ здатна активувати гіпоксія-індуцибельний фактор 1α (HIF- 1α), шляхом, який, ймовірно, не залежить від концентрації кисню, а за рахунок активації мітоген-активованого протеїнкіназного (МАРК) та фосфатидилінозитол-3-кіназного (PI3K)/Akt сигнальних шляхів. HIF- 1α , в свою чергу, здатна запускати експресію GLUT1, посилюючи активність транспорту глюкози в клітину [54].

Наступним нашим кроком було припущення, що підвищення поглинання глюкози лейкоцитами крові мало б впливати на їх енергозабезпечення. Для перевірки такого припущення ми вирішили дослідити вміст АТФ у лізатах лейкоцитів за досліджуваних умов (Рис. 26.). Таким чином, ми виявили, що за умов ЦД відбувається зниження вмісту АТФ у лейкоцитах (у 1,39 раза порівняно з контролем), однак за умов ЦД та дії ФБМТ вміст АТФ у цих клітинах збільшується у 1,52 раза порівняно із неопроміненими тваринами. Достовірних змін у вмісті АТФ у лейкоцитах контрольних тварин та здорових тварин, яких піддавали дії ФБМТ ми не виявили.

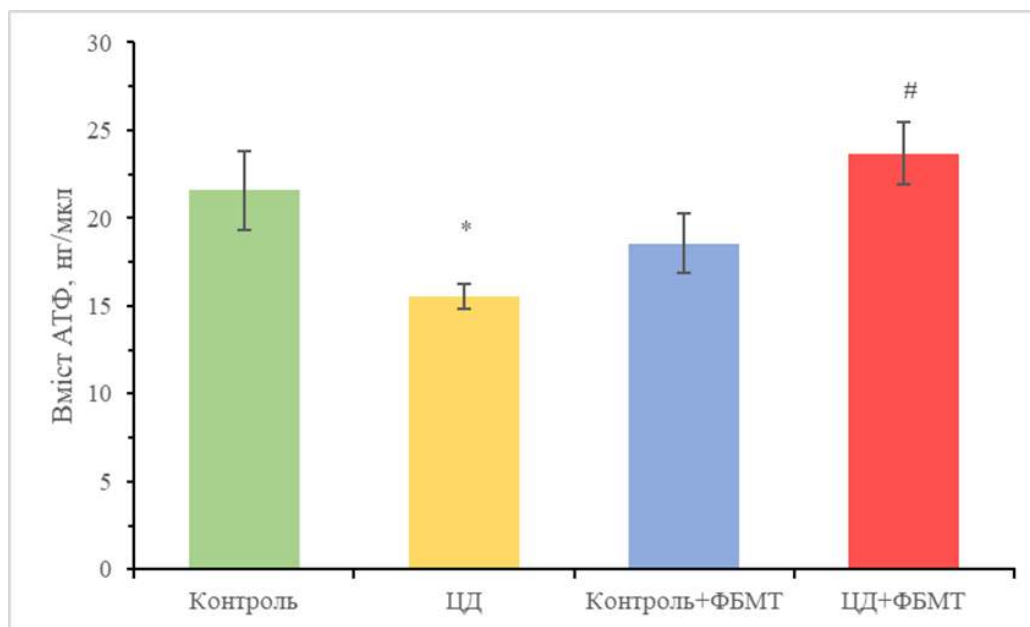


Рис. 26. Вміст АТФ у лізатах лейкоцитів, нг/мкл.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Ці дані підтверджують позитивний вплив ФБМТ на транспортування глюкози в лейкоцити та на покращення їх енергозабезпечення.

Підсумки до розділу:

Показано позитивний вплив ФБМТ на глікемічний профіль організму щурів за умов ЕЦД. Виявлено підвищення активності транспорту глюкози у лейкоцити та покращення їх енергозабезпечення.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [3; 67]

3.4. Вплив ФБМТ на функціональний стан лейкоцитів крові щурів за умов ЕЦД

Периферична кров є тією системою, яка відображає стан цілого організму, адже на ній позначається дія чинників, що провокують розвиток патології будь-якої етіології. Найчастіше за патологічного стану виникають порушення кисеньтранспортної функції еритроцитів, а також розлади імунної системи, за яку відповідальними є лейкоцити.

Дослідження, які вивчали активність імунної відповіді у хворих на ЦД вперше почали з'являтися ще в 1960-х роках, зокрема було показано, що у поліморфноядерних лейкоцитах (ПМЯЛ) порушується хемотаксис під час кетоацидозу. Алексієвич та співавт. виявили порушену здатність до фагоцитозу у лейкоцитах хворих на ЦД 2 типу, що було пов'язано із глікемічним контролем, оскільки покращений контроль за рівнем глюкози протягом 3 місяців підвищував активність фагоцитозу [14]. Відомо також, що зниження активності МПО призводить до пригнічення фагоцитозу нейтрофілами та підвищення ризику інфекцій у хворих на ЦД [13]. Загалом, існує цілий спектр порушень у роботі імунної системи у хворих на ЦД, проте найважливішим фактором, що сприяє підвищеній сприйнятливості до інфекцій, є погіршення функцій лейкоцитів [46].

Щоб детальніше дослідити вплив ФБМТ на функціональну активність лейкоцитів у разі ЦД ми вирішили перевірити зміни їх фагоцитарної активності. Найбільш інформативними для оцінки активності фагоцитозу вважають фагоцитарний показник (ФП) – відсоток клітин, що вступили в фагоцитоз зі

загальної кількості підрахованих нейтрофілів. Встановлено, що у тварин з ЕЦД при інкубації лейкоцитів впродовж 30 хв ФП знизився у 1,11 раза, у порівнянні з показниками у здорових тварин. За дії ФБМТ за умов ЦД ФП після 30 хв інкубації клітин підвищувався у 1,02 раза порівняно з аналогічними показниками у неопромінених тварин (Рис. 27А).

Після 120 хв інкубації клітин, у щурів з ЦД ФП нейтрофільних гранулоцитів знижувався у 1,05 раза, проте за дії ФБМТ при ЦД цей показник мав тенденцію до зростання, однак зміни виявилися недостовірними (Рис. 27Б).

На основі одержаних результатів ФП нами було обраховано індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ), який визначається як співвідношення між середньою кількістю фагоцитованих мікроорганізмів через 30 хвилин інкубації до середньої їх кількості через 120 хвилин інкубації. Індекс завершеності фагоцитозу свідчить про перетравлювальну здатність поліморфноядерних лейкоцитів.

У контрольних тварин ІЗФ складав 1,11, що вказує на завершеність фагоцитозу, у тварин з ЦД досліджуваний показник знижувався у 1,54 раза порівняно з контролем, і відповідно становив 0,72 (Рис. 28.).

При дії ФБМТ ми спостерігали різноспрямований ефект у зміні ІЗФ нейтрофілів контрольних тварин та тварин з ЦД. У здорових тварин спостерігалось зниження цього показника у 1,19 раза, натомість у тварин з ЦД ІЗФ збільшення у 1,28 раза та наближення до рівня контролю.

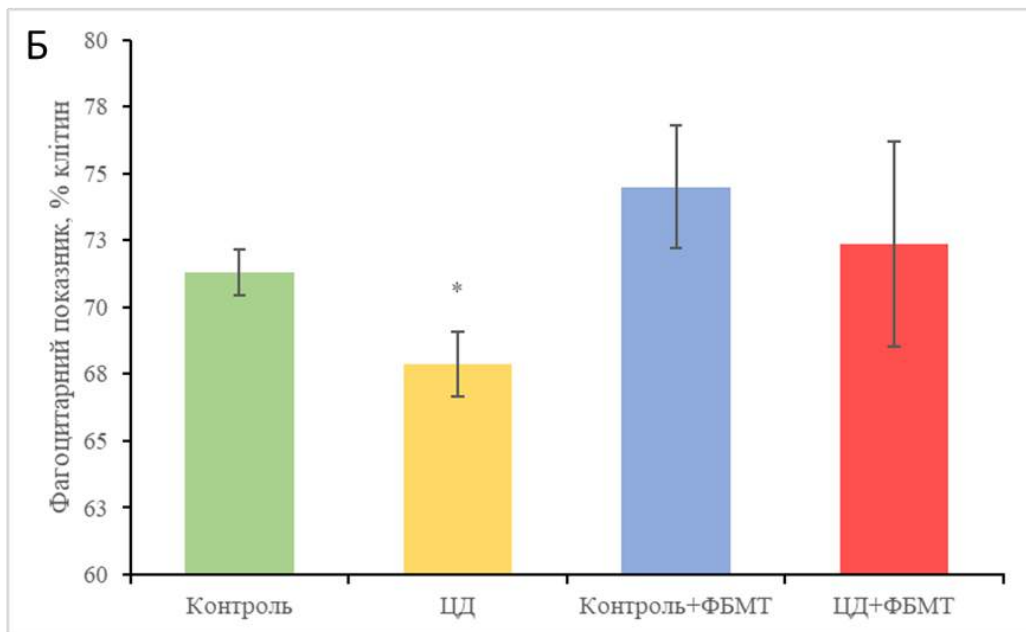
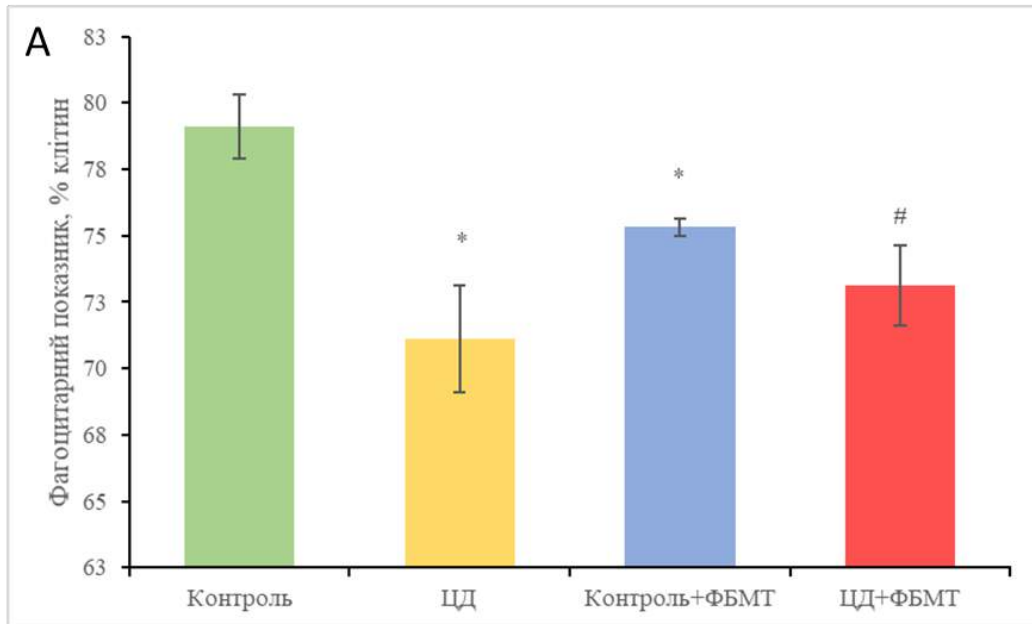


Рис. 27. Фагоцитарний показник нейтрофільних гранулоцитів після 30 хв (А) та 120 хв (Б) інкубації, %.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

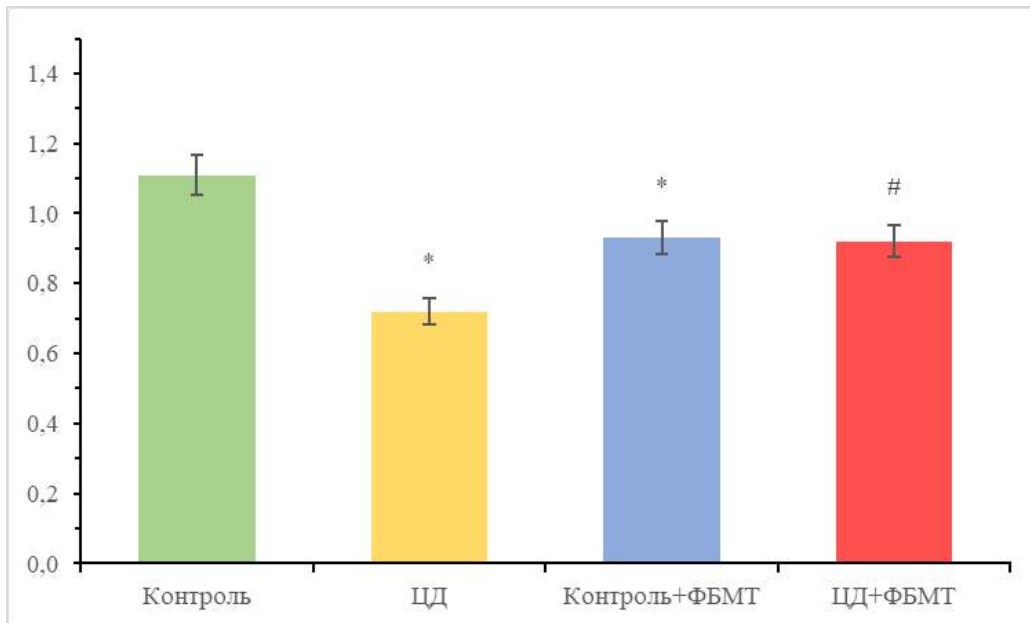


Рис. 28. Зміна індексу завершеності фагоцитозу.

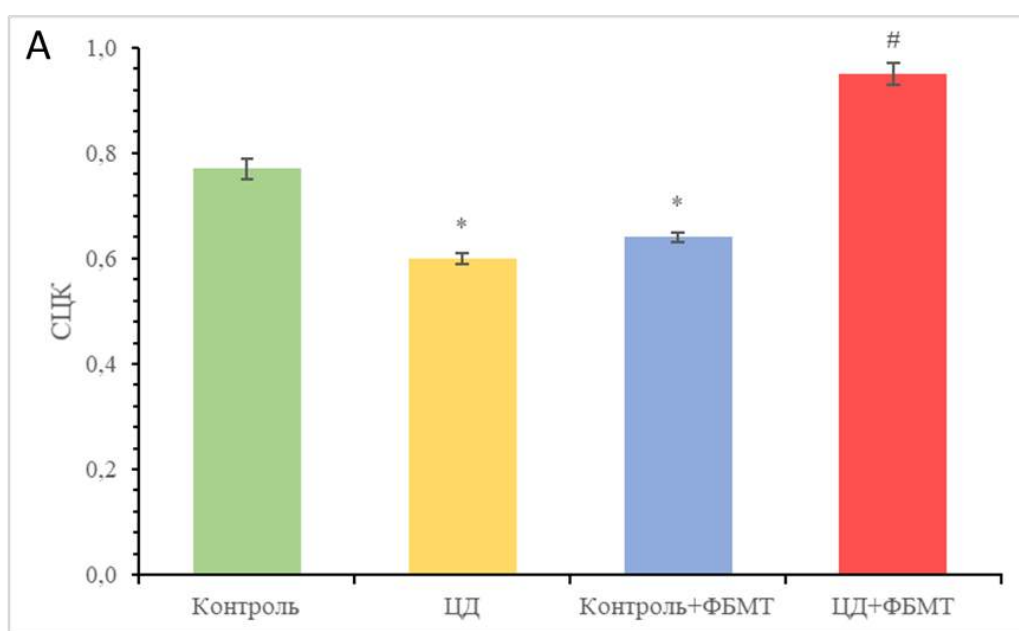
* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

Фагоцитоз – складний енергозалежний процес, котрий потребує чіткої реорганізації цитоскелету та дегрануляції нейтрофілів. Окрім цього, існують дослідження про те, що процес фагоцитозу у лейкоцитах залежить від надходження енергії через розщеплення глюкози шляхом гліколізу [77]. Зміни процесу гліколізу у лейкоцитах за умов ЦД малодосліджені, однак деякі роботи вказують на пригнічення гліколізу через зниження активності фосфофруктокінази [49]. Інші дослідники, навпаки, виявили підвищену активність фосфофруктокінази, проте зниження активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, ключового ферменту пентозофосфатного шляху. Таким чином, однозначно можна стверджувати, що за ЦД порушується вуглеводний обмін у лейкоцитах. Важливо також зазначити, що попри таку суперечність у зміні активності фосфофруктокінази, виявлено, що терапія інсуліном здатна нівелювати негативний вплив ЦД на вуглеводний обмін у лейкоцитах, навіть якщо змін у гіперглікемії не спостерігається [12]. Це вказує на те, що саме порушення у надходженні глюкози у клітину відповідальне за порушення функціонування лейкоцитів за ЦД.

Оскільки під час «респіраторного вибуху» генерується велика кількість супероксид-аніону, то за кількістю клітин, що містили забарвлені гранули ми оцінювали бактерицидну активність лейкоцитів (нейтрофільних гранулоцитів). НСТ-тест характеризує активність NADPH-оксидази та «респіраторного вибуху» в нейтрофілах. Спонтанний НСТ-тест відображає нормальний стан цього процесу, а стимульований – потенційну здатність клітин здійснювати свою бактерицидну функцію у відповідь на додатковий стимул, яким у нашому випадку виступали клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

При дослідженні спонтанної продукції супероксиду нейтрофільними гранулоцитами ми виявили зниження показника СЦК у 1,28 раза за умов ЦД (Рис. 29А). За дії ФБМТ ми спостерігали різноспрямований вплив на показник СЦК: у контрольних тварин, яких опромінювали відбувалося його зниження у 1,20 раза, тоді як у тварин з ЦД – підвищення у 1,58 раза порівняно із неопроміненими тваринами. Щодо стимульованого НСТ-тесту, то ми не виявили змін СЦК між групами контрольних тварин, щурів з ЦД та здорових тварин, який піддавали дії ФБМТ (Рис. 29Б). Однак у щурів з ЦД, яких опромінювали ми виявили підвищення СЦК у 1,5 раза, порівняно із неопроміненими тваринами з ЦД.



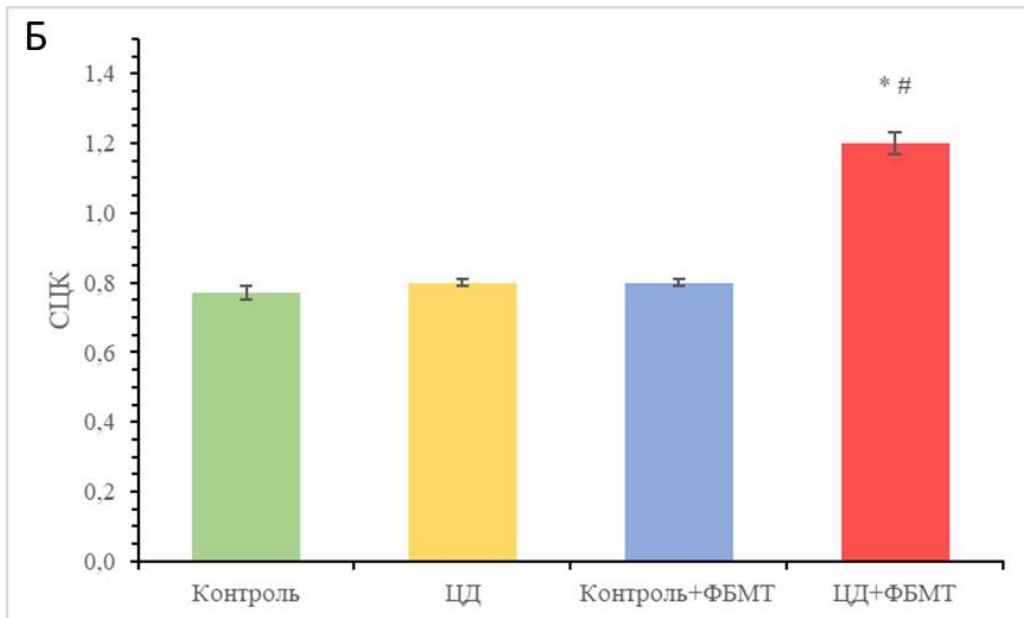


Рис. 29. Спонтанний (А) та стимульований (Б) НСТ–тест нейтрофільних гранулоцитів.

* – різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$;

– різниця вірогідна порівняно з ЦД, $P < 0,05$.

У літературі зустрічаються суперечливі дані щодо продукції АФО лейкоцитами за умов ЦД. Деякі дослідження повідомляють про підвищення продукції АФО у нейтрофілах завдяки розвитку оксидативного стресу за умов ЦД. Це також підтверджується нашими даними (рис. 4А). Одночасно з цим, інші дослідження вказують на зниження активності респіраторного вибуху при ЦД через пригнічення активності NADPH-оксидази. Це відбувається завдяки тому, що гіперглікемія пригнічує активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, одна з функцій якої – підтримка рівня NADPH, субстрату для NADPH-оксидази [57]. Це також узгоджується з нашими даними НСТ-тесту, який демонструє зниження продукції $O_2^{\cdot -}$ за умов ЦД та підвищення за дії ФБМТ.

Підсумки до розділу:

Виявлено підвищення активності фагоцитозу та продукції супероксиду за умов ЕЦД та впливу ФБМТ. Отже, антигіперглікемічний ефект ФБМТ, її здатність покращувати надходження глюкози всередину лейкоцитів та її антиоксидантна активність свідчить про позитивний вплив як на

енергозабезпечення, так і на про-/антиоксидантний баланс клітин і, в подальшому на їх функціональну активність.

Представлені вище результати опубліковано у статті [67]

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні результати дисертаційної роботи дозволяють запропонувати ряд висновків щодо біохімічних ефектів ФБМТ за умов ЕЦД.

Докази, зібрані в ході багатьох великих проспективних рандомізованих досліджень та ретроспективних аналізів баз даних, підтвердили важливість раннього втручання після діагностики ЦД для забезпечення ефективного контролю рівня глікемії. Відповідне лікування з моменту встановлення діагнозу для мінімізації гіперглікемічного навантаження може відстрочити початок і зменшити тяжкість мікрovasкулярних ускладнень. Пізнє втручання (після років або десятиліть неадекватно контрольованої гіперглікемії) є менш ефективним, особливо проти макроваскулярних наслідків [21].

Наразі існує цілий ряд фармакологічних препаратів, що призначені для контролю рівня глюкози у крові, проте вони іноді виявляються недостатньо ефективними та мають побічні ефекти, зокрема метформін може викликати нестачу вітамінів В12 та фолієвої кислоти [51]. Тому надзвичайно важливим є пошук нових методів подолання гіперглікемії та полегшення супутніх ускладнень цукрового діабету, викликаних розвитком оксидативного стресу.

ФБМТ є неінвазивною та демонструє низку позитивних ефектів (антибактеріальна, протизапальна та антиоксидантна дії, активація проліферації клітин та синтезу колагену та ін.), що дозволяють її потенційне застосування для лікування діабетичних порушень. ФБМТ для лікування ЦД та його ускладнень наразі застосовується спорадично та емпірично у якості допоміжної терапії, адже повноцінному її застосуванню запобігає недостатня з'ясованість молекулярних механізмів її дії.

Відомо, що за ЦД від неконтрольованої гіперглікемії першими страждають кровоносна система та клітини крові. Тому одним із завдань нашої роботи було дослідити вплив ФБМТ на деякі гематологічні показники та на функціонування гемоглобіну.

Отримані нами результати свідчать про нормалізуючий вплив ФБМТ на роботу системи еритрону у щурів, яка дуже виснажується при ЕЦД. Також наші дані дослідження стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика свідчать про нормалізацію стану мембран зрілих еритроцитів, а дані спорідненості гемоглобіну до кисню – про нормалізацію кисень-транспортної функції крові. Ці дані узгоджуються із наявними у літературі повідомленнями про позитивний вплив ФБМТ на мікроциркуляцію крові. Більше того, виявлене нами зменшення вмісту глікозильованого гемоглобіну та покращення кисень-транспортної функції гемоглобіну можуть пояснити позитивні ефекти ФБМТ при лікуванні синдрому діабетичної стопи [126].

Для того, щоб ФБМТ проявляла біологічні ефекти, енергія світлового випромінювання повинна поглинатися молекулою-хромофором. Ми припустили, що таку функцію для нашого типу ФБМТ може виконувати протопорфірин. Ми виявили підвищення його вмісту за ЦД та дії ФБМТ, що може свідчити про його роль акцептора світлового випромінювання, що опосередковує його біологічні ефекти.

Перш за все, ми не виявили достовірних змін у вмісті АФО за дії ФБМТ та ЕЦД. Разом з тим, виявлене нами збільшення вмісту АФО у контрольних тварин за дії ФБМТ свідчить про те, що ФБМТ не має прямого впливу на вміст цих сполук. Однак, аналіз вмісту ТБК-пп у плазмі, гемолізатах еритроцитів та лізатах лейкоцитів продемонстрував зменшення рівня ПОЛ, а отже і окисного стресу у організмі тварин за ЕЦД та дії ФБМТ. Тому ми припустили, що ФБМТ впливає на ферментну систему антиоксидантного захисту клітини.

Ми виявили підвищення активності СОД та МПО, а також тенденцію до підвищення активності каталази у лізатах лейкоцитів щурів з ЕЦД та за дії ФБМТ. Ми також спостерігали зниження активності МПО у плазмі крові та NOS у лізатах лейкоцитів щурів з ЕЦД за дії ФБМТ. Такий вплив ФБМТ на активність ферментів системи про-/антиоксидантного балансу може модулювати рівень оксидативного стресу за умов ЕЦД.

Ми виявили, що за умов ЕЦД, вміст NO_2^- , а також ОМБ нейтрального та основного характеру зростає. В той же час, опромінення тварин із ЕЦД сприяє зниженню вмісту ОМБ та NO_2^- у лейкоцитах крові.

Також ми виявили, що у лізатах лейкоцитів крові щурів за умов ЕЦД вміст АОРPs знижується, а за дії ФБМТ підвищується, прямуючи до контрольних значень. У плазмі крові спостерігається протилежна ситуація, за умов ЕЦД вміст АОРPs зростає, проте за дії ФБМТ та умов ЕЦД – знижується. Оскільки АОРPs це група сполук, які утворюються під час взаємодії білків з НОС1 і хлораминами, а НОС1, в свою чергу, продукується МПО, то стає зрозумілим, що такі зміни цього показника окисного стресу відбуваються завдяки різній активності МПО за досліджуваних умов. Також варто зауважити, що збільшення вивільнення кисню з молекули гемоглобіну частково пояснює тенденцію до збільшення АОРPs при ЦД+ФБМТ.

Ми отримали подібні результати для вмісту AGEs за досліджуваних умов, тобто їх вміст знижується за умов ЕЦД та зростає за дії ФБМТ та умов ЕЦД у лізатах лейкоцитів, і навпаки, зростає за умов ЕЦД та знижується за дії ФБМТ та умов ЕЦД у плазмі крові. Відомо, що AGEs здатні стимулювати продукцію МПО у нейтрофілах [85], тому низький їх вміст пояснює знижену активність МПО у лейкоцитах. Результати імунодетекції RAGE (рецептора до AGEs) виявили підвищення його вмісту у плазмі крові щурів з ЕЦД та зниження за дії ФБМТ та умов ЕЦД. Між AGEs і RAGE існує позитивний зв'язок, коли підвищення одного показника, спричиняє зростання іншого [74]. Окрім того, одним із найважливіших наслідків AGE–RAGE взаємодії є надмірна продукція АФО [18]. ФБМТ завдяки своїй антиоксидантній дії здатна запобігти такому процесу нагромадження кінцевих продуктів глікації та розвитку оксидативного стресу.

Однак, відкритим залишається питання як саме, окрім впливу на ферменти системи про-/антиоксидантного балансу, ФБМТ впливає на рівень AGEs у організмі. Для цього ми вирішили дослідити вплив ФБМТ на глікемічний профіль організму щурів за умов ЕЦД.

Ми виявили зниження концентрації глюкози у крові та вмісту глікозильованого гемоглобіну у опромінюваних щурів з ЕЦД. Ми вважаємо, що причиною такого гіпоглікемічного ефекту ФБМТ може бути підвищене поглинання глюкози периферичними тканинами та клітинами крові зокрема. Дійсно, за умов ЕЦД ми спостерігали погіршення толерантності організму до навантаження глюкозою, однак за умов ЕЦД та дії ФБМТ відбувалося покращення цього показника.

Адекватне поглинання глюкози імунними клітинами відіграє надзвичайно важливу роль у їх функціонуванні. Відомо, що імунні клітини експресують на своїй поверхні інсулінові рецептори та здатні відповідати на сигнал інсуліну [30]. Окрім того, нестача енергетичних субстратів, зокрема глюкози, пригнічує активність імунної системи [124]. Тому логічним є припущення, що нестача інсуліну за ЕЦД може впливати на енергозабезпеченні лейкоцитів. Ми виявили, що за умов ЕЦД відбувається зниження поглинання глюкози лейкоцитами, проте при опроміненні тварин з ЕЦД відбувається підвищення цього показника. Окрім того, за дії ФБМТ на здорових щурів також відбувається підвищення активності поглинання глюкози.

Механізм такого впливу ФБМТ важко пояснити, адже дослідження транспорту глюкози та активності її транспортерів у лейкоцитах малочисельні та суперечливі. Згідно даних літератури, у лейкоцитах периферичної крові наявні такі транспортери глюкози: GLUT1, GLUT3, GLUT6 та GLUT9. Однак інші дослідження стверджують, що у лейкоцитах людини на плазматичній мембрані експресуються три типи глюкозних транспортерів: GLUT1, GLUT3 та GLUT4 [88]. Варто зауважити, що у щурів, на відміну від людей, GLUT3 експресується лише у мозку, тож GLUT1 та GLUT4 лишаються єдиною мішенню для ФБМТ. Відомо, що ФБМТ здатна активувати гіпоксія-індуцибельний фактор 1 α (HIF-1 α), шляхом, який, ймовірно, не залежить від концентрації кисню, а за рахунок активації мітоген-активованого протеїнкіназного (MAPK) та фосфатидилінозитол-3-кіназного (PI3K)/Akt сигнальних шляхів. HIF-1 α , в свою чергу, здатна запускати експресію GLUT1, посилюючи активність транспорту

глюкози в клітину [54]. Окрім того, є дані, що ФБМТ сприяє транслокації GLUT4 до плазматичної мембрани за рахунок активації PI3-K/Akt сигнального шляху [59]. Підвищене поглинання глюкози за дії ФБМТ також пояснює збільшення вмісту AGEs та активності МПО у лейкоцитах за умов ЕЦД та опромінення.

Окрім підвищення поглинання глюкози лейкоцитами, ФБМТ також покращує їх енергозабезпечення, адже ми виявили, що за умов ЕЦД та дії відбувається збільшення вмісту АТФ у лейкоцитах, в той час як за умов ЕЦД цей показник знижується. Згідно даних літератури, це відбувається завдяки пришвидшенню реакцій перенесення електронів у мітохондріях за дії світла. Таке пришвидшення реакцій у електрон-транспортному ланцюзі призводить до підвищеної продукції АТФ [53].

На наступному етапі нашого дослідження ми вирішили перевірити вплив ФБМТ на функціональний стан лейкоцитів щурів з ЕЦД, зокрема на їх фагоцитарну активність та рівень продукції супероксиду (показник активності «респіраторного вибуху» та бактерицидної активності лейкоцитів).

Нами встановлено, що у тварин з ЕЦД активність фагоцитозу є нижчою (зниження ФП та ІЗФ), однак за дії ФБМТ та умов ЦД активність фагоцитозу зростає (підвищення ФП та ІЗФ). Окрім цього, ми виявили зниження продукції супероксиду у лейкоцитах щурів з ЕЦД та підвищення у лейкоцитах опромінених щурів з ЕЦД. Такі зміни функціональної активності лейкоцитів за умов ЕЦД та дії ФБМТ можна пояснити покращенням поглинання глюкози цими клітинами та їх енергозабезпечення, адже відомо, що процес фагоцитозу у лейкоцитах залежить від надходження енергії через розщеплення глюкози шляхом гліколізу [77].

Рівень продукції супероксиду свідчить про активність NADPH-оксидази, ключового ферменту процесу «респіраторного вибуху», який забезпечує бактерицидну активність лейкоцитів. Відомо, що гіперглікемія пригнічує активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, одна з функцій якої – підтримка рівня NADPH, субстрату для NADPH-оксидази [57].

Таким чином, гіпоглікемічна активність ФБМТ, її здатність покращувати поглинання глюкози та енергозабезпечення лейкоцитів, а також її антиоксидантна активність забезпечує позитивний вплив на функціональну активність лейкоцитів та запобігає розвитку оксидативного стресу.

Узагальнена схема отриманих нами результатів представлена на Рис. 30. Коротко, ФБМТ через свій вплив на протопорфірин спричиняє фотодинамічний ефект, який призводить до підвищення рівня маркерів оксидативного стресу у здорових тварин. Одночасно з цим, за ЦД ФБМТ проявляє позитивний ефект на систему еритроноу. Також, завдяки гіпоглікемічній дії ФБМТ підвищує стійкість мембран до дії кислотного гемолітика, покращує кисень-транспортну функцію гемоглобіну та збільшує вміст протопорфірину. Збільшення вмісту кисню також робить свій внесок у підвищення маркерів оксидативного стресу у здорових тварин за дії ФБМТ. Окрім того, ФБМТ позитивно впливає на розвиток оксидативного стресу за ЦД, проявляючи антиоксидантну дію та нормалізуючи рівень маркерів оксидативного стресу у крові та лейкоцитах зокрема. Наприклад, підвищення активності СОД напряду впливає на бактерицидну активність, а зростання рівня кінцевих продуктів глікації опосередковано збільшує активність МПО. І наостанок, покращення надходження глюкози та енергозабезпечення лейкоцитів позитивно впливає на їх функціональну активність та про-/антиоксидантний баланс у клітині.

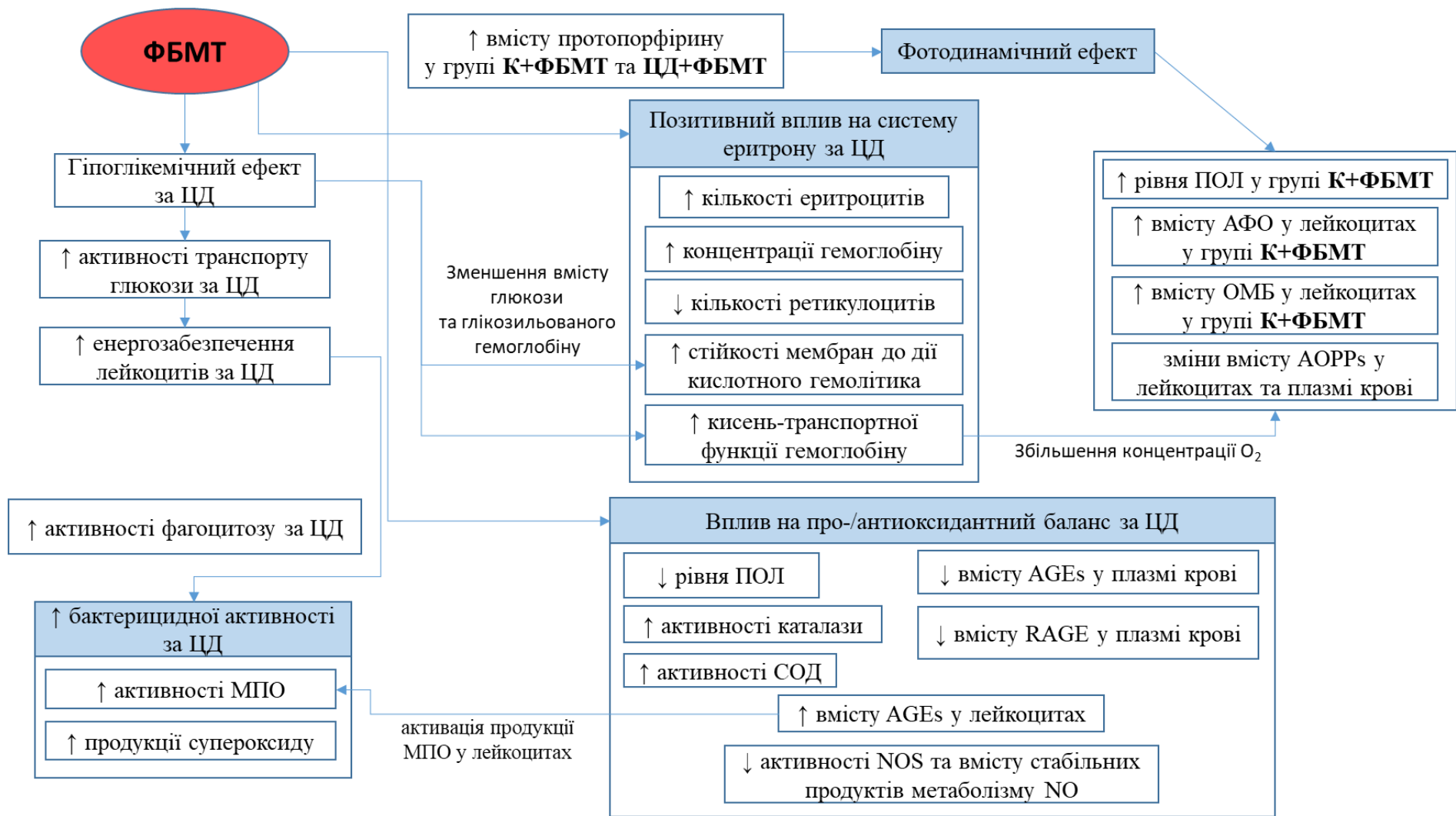


Рис. 30. Схема причинно-наслідкових зв'язків змін досліджуваних показників.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень з'ясовано біохімічні ефекти ФБМТ на систему крові щурів за умов ЕЦД. Показано позитивний коригуючий вплив ФБМТ на прооксидантно/антиоксидантний баланс та функціональний стан лейкоцитів завдяки її здатності підвищувати поглинання глюкози клітинами, нормалізуючи їхнє енергозабезпечення.

1. Встановлено позитивний коригуючий вплив ФБМТ на цитологічні показники у щурів з ЕЦД. Виявлено збільшення кількості еритроцитів, ретикулоцитів, сегментоядерних нейтрофілів та зменшення кількості лімфоцитів. За дії ФБМТ спостерігається підвищення стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика, підвищення концентрації гемоглобіну та покращення його кисень-транспортної функції. Експериментально показано можливість протопорфірину слугувати фотоакцептором ФБМТ, у застосованих довжинах хвиль, і виявляти фотодинамічний ефект.
2. Показано, що ФБМТ проявляє антиоксидантний ефект за умов ЕЦД, знижуючи рівень продуктів ПОЛ у плазмі крові, еритроцитах та лейкоцитах, а також вміст ОМБ, нітритів у лізатах лейкоцитів та AOPPs, AGEs та RAGE у плазмі крові. Однак, рівень АФО у лейкоцитах щурів з ЕЦД за дії ФБМТ не змінюється, а вміст AOPPs і AGEs підвищується.
3. Виявлено, що вплив ФБМТ на маркерні показники розвитку оксидативно-нітративного стресу опосередкований зміною активності ферментів. За умов ЕЦД та дії ФБМТ активність СОД зростає, однак активність каталази має лише тенденцію до підвищення. В той же час, активність сумарної та індукцибельної NOS знижується.
4. ФБМТ має виражену гіпоглікемічну активність, про що свідчить зниження концентрації глюкози та вмісту глікозильованого гемоглобіну у крові, а також покращення толерантності організму тварин до навантаження глюкозою. Такий ефект обумовлений підвищенням активності поглинання глюкози клітинами (зокрема лейкоцитами). Посилене поглинання глюкози

сприяє покращенню енергозабезпечення лейкоцитів, про що свідчить підвищення вмісту АТФ.

5. ФБМТ позитивно впливає на функціональний стан лейкоцитів щурів за умов ЕЦД. За дії ФБМТ збільшується продукція супероксиду та зростає активність МПО, що сприяє нормалізації бактерицидної активності лейкоцитів. Також за дії ФБМТ підвищується активність фагоцитозу у лейкоцитах.
6. Отримані результати свідчать, що застосування ФБМТ як допоміжний вид терапії ЦД та його ускладнень є перспективним.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ганчева О. В. Патогенетичний зв'язок дисбалансу ізоформ синтази оксиду азоту в панкреатичних острівцях підшлункової залози із хронічною пренатальною гіперглікемією / О.В. Ганчева, Ю.М. Колесник, Ю.І. Вородєєва // Запорожский медицинский журнал. – 2016. – №1. – С. 35-39.
2. Дрель В.Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу / В. Р. Дрель // Біол. Студ. – 2010. – Т. 4, №2. – С. 141-158.
3. Кармаш О.І., Люта М.Я., Єфіменко Н.В., Коробов А.М., Сибірна Н.О. / Вплив низькоінтенсивного світлового випромінювання на глікемічний профіль та фізико-хімічні характеристики еритроцитів за умов цукрового діабету у щурів. // Фізіол. Журн. – 2018. Т. 64(6). С. 68-76.
4. Коваленко О.В. Но-залежні зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз за умов відтворення травматичного сіалоаденіту / О.В. Коваленко, В.О. Костенко // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 4. – С. 106-110.
5. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, И.Г. Иванова, И.Г. Майорова [та ін.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
6. Литвинець Є.А. Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантний захист у разі патології сечовидільної системи, доцільність використання біофлавоноїдів у комплексному лікуванні / Є.А. Литвинець, Я.В. Гоцуляк // Здоровье мужчины. – 2012. – №1. – С. 135-137.
7. Мецишин І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків / І.Ф. Мецишин // Буков. мед. вісник. – 1999.– №1. – С.196–205.

8. Сибірна Н.О. Методи дослідження системи крові / Н.О. Сибірна, В.А. Бурда, Я.П. Чайка– Львів: Видавн. центр Львів. нац. ун-ту, 2006. – 100 с.
9. Тимирбулатов Р.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р.А. Тимирбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
10. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте / С. Чевари, Т.Д. Андял, Д. Штиренгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
11. Acharya A. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential / A. Acharya, I. Das, D. Chandhok, T. Saha // Oxid Med Cell Longev. – 2010. – Vol. 3, №1. – P. 23-34.
12. Alba-Loureiro T.C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils / T.C. Alba-Loureiro, S.M. Hirabara, J.R. Mendonça, R. Curi, T.C. Pithon-Curi // J Endocrinol. – 2006. – Vol. 188, №2. – P. 295-303.
13. Alba-Loureiro T.C. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus / T.C. Alba-Loureiro, C.D. Munhoz, J.O. Martins, G.A. Cerchiaro, C. Scavone, R. Curi, P. Sannomiya // Braz J Med Biol Res. – 2007. – Vol. 40, №8. – P. 1037-44.
14. Alexiewicz J.M. Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function / J.M. Alexiewicz, D. Kumar, M. Smogorzewski, M. Klin, S.G. Massry // Ann Intern Med. – 1995 – Vol. 123, №12. – P. 919-24.
15. American Diabetes Association. (2) Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care. – 2015. – Vol. 38. – P. S8-S16.
16. Antunes F. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide / F. Antunes, A. Boveris, E. Cadenas // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – Vol. 101, №48. – P. 16774-9.

17. Arvan P. Islet autoantigens: structure, function, localization, and regulation / P. Arvan, M. Pietropaolo, D. Ostrov, C.J. Rhodes // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2012. – Vol. 2, №8. – P. a007658.
18. Asadipooya K. Advanced Glycation End Products (AGEs), Receptor for AGEs, Diabetes, and Bone: Review of the Literature / K. Asadipooya, E.M. Uy // J Endocr Soc. – 2019. – Vol. 3, №10. – P. 1799-1818.
19. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all / R. Augustin // IUBMB Life. – 2010. – Vol. 62, №5. – P. 315-33.
20. Babu N. Alterations in Aggregation Parameters of Erythrocytes Due to Hyper Cholesterol in Type-2 Diabetes Mellitus / N. Babu // The Open Circulation & Vascular Journal. – 2009. – Vol. 2. – P. 10-14.
21. Bailey C.J. The Current Drug Treatment Landscape for Diabetes and Perspectives for the Future / C.J. Bailey // Clin Pharmacol Ther. – 2015. – Vol. 98, №2. – P. 170-84.
22. Bajaj S. Antioxidants and diabetes / S. Bajaj, A. Khan // Indian J Endocrinol Metab. – 2012. – Vol. 16. – P. 267-271.
23. Bandyk D.F. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment / D.F. Bandyk // Semin Vasc Surg. – 2018. – Vol. 31. – P. 43-48.
24. Bazhora Y.I. Simplified method of NBT-test / Y.I. Bazhora // Lab delo. – 1981. – Vol. 4. – P. 198-200.
25. Benesch R. Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer / R. Benesch, G. Macduff, Re. Benesch // Anal. Biochem. – 1965. – Vol. 11. – P. 81-87.
26. Bottazzo G.F. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies / G.F. Bottazzo, A. Florin-Christensen, D. Doniach // Lancet. – 1974. – Vol. 2, №7892. – P. 1279-1283.
27. Boyer F. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs / F. Boyer, J.B. Vidot, A.G. Dubourg, P. Rondeau, M.F. Essop, E. Bourdon // Oxid Med Cell Longev. – 2015. – P. 534873.

28. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow, with special reference to factors which influence and modify sedimentation properties of hematopoietic cells / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – Vol. 21(Suppl.) – P. 1–109.
29. Brunton S. Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding / S. Brunton // *J Fam Pract.* – 2016. – Vol. 65, №4. – P. 0416.
30. Calder P.C. Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues / P.C. Calder, G. Dimitriadis, P. Newsholme // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* – 2007. – Vol. 10, №4. – P. 531-40.
31. Capaldi R.A. Structure of cytochrome c oxidase / R.A. Capaldi, F. Malatesta, V.M. Darley-USmar // *Biochim Biophys Acta.* – 1983. – Vol. 726, №2. P. 135-148.
32. Chaudhury A. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management / A. Chaudhury, C. Duvoor, V.S. Reddy Dendi, S. Kraleti, A. Chada, R. Ravilla, A. Marco, N.S. Shekhawat, M.T. Montales, K. Kuriakose, A. Sasapu, A. Beebe, N. Patil, C.K. Musham, G.P. Lohani, W. Mirza // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2017. – Vol. 24, №8. – P. 1-12.
33. Chen L. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease / L. Chen, X.W. Chen, X. Huang, B.L. Song, Y. Wang, Y. Wang. // *Sci China Life Sci.* – 2019. – Vol. 62, №11. – P. 1420-1458.
34. Chen Y. 2-NBDG as a Marker for Detecting Glucose Uptake in Reactive Astrocytes Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation In Vitro / Y. Chen, J. Zhang, Xy Zhang // *J Mol Neurosci.* – 2015. – Vol.55. – P. 126–130.
35. Chibber R. Leukocytes in diabetic retinopathy / R. Chibber, B.M. Ben-Mahmud, S. Chibber, E.M. Kohner // *Curr Diabetes Rev.* – 2007. – Vol. 3, №1. – P. 3-14.
36. Chung H. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy / H. Chung, T. Dai, S.K. Sharma, Y.Y. Huang, J.D. Carroll, M.R. Hamblin. // *Ann Biomed Eng.* – 2012. – Vol. 40, №2. – P. 516-533.

37. Dawson J. A microtiter-plate assay of human NOS isoforms / J. Dawson, R.G. Knowles // *Methods Mol Biol.* – 1998. – Vol. 100. – P. 237-42.
38. de Freitas L.F. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy / L.F. de Freitas, M.R. Hamblin // *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* – 2016. – Vol. 22, №3. – P. 7000417.
39. DeFronzo R.A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus / R.A. DeFronzo // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58, №4. – P. 773-795.
40. DeFronzo R.A. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM / R.A. DeFronzo // *Diabetes.* – 1988. – Vol. 37, №6. – P. 667-87.
41. Deshpande A.D. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications / A.D. Deshpande, M. Harris-Hayes, M. Schootman // *Phys Ther.* – 2008. – Vol. 88, №11. – P. 1254-1264.
42. DiMeglio L.A. Type 1 diabetes / L.A. DiMeglio, C. Evans-Molina, R.A. Oram // *Lancet.* – 2018. – Vol. 391, №10138. – P. 2449-2462.
43. Drel V.R. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats / V.R. Drel, N. Sybirna // *Cell. Biol. Int.* – 2010. – Vol. 34. – P. 1147–1153.
44. Duan R. Signal transduction pathways involved in low intensity He-Ne laser-induced respiratory burst in bovine neutrophils: a potential mechanism of low intensity laser biostimulation / R. Duan, T.C. Liu, Y. Li, H. Guo, L.B. Yao // *Lasers Surg Med.* – 2001. – Vol. 29, №2. – P. 174-178.
45. Dudzinska W. Purine nucleotides and their metabolites in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus / W. Dudzinska // *J. Biomedical Science and Engineering.* – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 38-44.
46. Dulkadiroğlu E. The evaluation of intracellular energy metabolism in prediabetic patients and patients newly diagnosed with type 2 diabetes mellitus / E. Dulkadiroğlu, H. Özden, H. Demirci // *Turk J Med Sci.* – 2021. – Vol. 51, №1. – P. 238-245.

47. Dunning B.E. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications / B.E. Dunning, J.E. Gerich // *Endocr Rev.* – 2007. – Vol. 28, №3. – P. 253-83.
48. Eichler M. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells / M. Eichler, R. Lavi, A. Shainberg, R. Lubart // *Lasers Surg Med.* – 2005. – Vol. 37, №4. – P. 314-319.
49. Esmann V. The polymorphonuclear leukocyte in diabetes mellitus / V. Esmann // *J Clin Chem Clin Biochem.* – 1983. – Vol. 21, №9. – P. 561-7.
50. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species / T. Finkel // *J Cell Biol.* – 2011. – Vol. 194, №1. P. 7-15.
51. Fogelman Y. Vitamin B12 screening in metformin-treated diabetics in primary care: were elderly patients less likely to be tested? / Y. Fogelman, E. Kitai, G. Blumberg, A. Golan-Cohen, M. Rapoport, E. Carmeli // *Aging Clin Exp Res.* – 2017. – Vol. 29, №2. – P. 135-139.
52. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // Oxford University Press, 2015. – P. 961.
53. Hamblin M. Mechanisms of low level light therapy / M. Hamblin, T.N. Demidova // *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering.* – 2006. – Vol. 6140. – P. 1-12.
54. Hamblin M.R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation / M.R. Hamblin // *Photochemistry and photobiology.* – 2018. – Vol. 94, №2. – P. 199-212.
55. Hayden M.R. Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease / M.R. Hayden, S.C. Tyagi, M.M. Kerklo, M.R. Nicolls // *JOP.* – 2005. – Vol. 6, №4. – P. 287-302.
56. Himsworth H.P. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types / H.P. Himsworth // *The Lancet.* – 1936. – Vol. 227, №5864. – P. 127-130.
57. Huang J Neutrophils in type 1 diabetes / J. Huang, Y. Xiao, A. Xu, Z. Zhou // *J Diabetes Investig.* – 2016. – Vol. 7, №5. – P. 652-63.

58. Huang L. Photoactivation of Akt1/GSK3 β Isoform-Specific Signaling Axis Promotes Pancreatic β -Cell Regeneration / L. Huang, X. Jiang, L. Gong, D. Xing // *J Cell Biochem.* – 2015. – Vol. 116, №8. – P. 1741-54.
59. Huang L. Photoactivation of GLUT4 translocation promotes glucose uptake via PI3-K/Akt2 signaling in 3T3-L1 adipocytes / L. Huang, L. Gong, X. Jiang, D. Xing // *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* – 2013. – Vol. 7, №3. – P. 1-10.
60. Ighodaro O.M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus / O.M. Ighodaro // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 108. – P. 656-662.
61. Ivanov I.T. Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes / I.T. Ivanov // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* – 2007. – Vol. 147, №4. – P. 876-84.
62. Ivanov Y.G. Modification of the spectrophotometric method for determining the oxygen-dissociation curves of hemoglobin / Y.G. Ivanov // *Bul. of exp. biol. and medicine.* – 1975. – Vol. 11. – P. 122-125.
63. Ivanova Y.V., Klimova E.M., Prasol V.A., Mushenko E.V., Korobov A.M., Pogorielov M.V., Timchenko D.S., Serbin M.E., Kirienco D.O. Phototherapy in complex treatment of wounds in patients with ischemic and neuroischemic form of diabetic syndrome // *Photobiology and Photomedicine.* – 2018. – Vol. 15, №1(24). – P. 13-20.
64. Kahn S.E. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future / S.E. Kahn, M.E. Cooper, S. Del Prato // *Lancet.* – 2014. – Vol. 383, №9922. – P. 1068-83.
65. Kalousová M. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus / M. Kalousová, J. Skrha, T. Zima // *Physiol Res.* – 2002. – Vol. 51, №6. – P. 597-604.
66. Karmash O. I. The effect of photobiomodulation therapy on some indices of rats' blood cells functional state under experimental diabetes mellitus / O. I.

- Karmash M., Ya. Liuta, N. V. Yefimenko, N. O. Sybirna // Biol. Stud. – 2021. Vol. 15(3). P. 3–16.
67. Karmash O. The Effect of Photobiomodulation Therapy on Energy Supply and Functional Activity of Leukocytes from Rats with Experimental Diabetes Mellitus / O. Karmash, M. Liuta, N. Yefimenko, N. Sybirna // Arch Dia & Obes. – 2022. – Vol. 3, N. 5. – P. 373-383. 4
68. Karmash O.I., Liuta M.Ya., Korobov A.M., Sybirna N.O. / Effect of Photomodulation Therapy on Development of Oxidative Stress in Blood Leukocytes of Rats with Streptozocin-Induced Diabetes Mellitus. // Cyt. and Genet. – 2020. Vol. 54 (5). P. 456-464.
69. Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon / T. Karu // J Photochem Photobiol B. – 1989. – Vol. 3, №4. – P. 638-40.
70. Karu T.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide / T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, N.I. Afanasyeva // Lasers Surg Med. – 2005. – Vol. 36, №4. – P. 307-314.
71. Karu T.I. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy / T.I. Karu, S.F. Kolyakov // Photomed Laser Surg. – 2005. – Vol. 23, №4. P. 355-361.
72. Kashyap S. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes / S. Kashyap, R. Belfort, A. Gastaldelli, T. Pratipanawatr, R. Berria, W. Pratipanawatr, M. Bajaj, L. Mandarino, R. DeFronzo, K. Cusi // Diabetes. – 2003. – Vol. 52, №10. – P. 2461-74.
73. Kaul K. Introduction to diabetes mellitus / K. Kaul, J.M. Tarr, S.I. Ahmad, E.M. Kohner, R. Chibber // Adv Exp Med Biol. – 2012. – Vol. 771. – P. 1-11.
74. Kay A.M. The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification / A.M. Kay, C.L. Simpson, J.A. Stewart Jr., J Diabetes Res. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-8.

75. Keenan H.A. Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes / H.A. Keenan, J.K. Sun, J. Levine, A. Doria, L.P. Aiello, G. Eisenbarth, S. Bonner-Weir, G.L. King // *Joslin Medalist Study. Diabetes.* – 2010. – Vol. 59, №11. – P. 2846-2853.
76. Krogvold L. Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes / L. Krogvold, B. Edwin, T. Buanes, G. Frisk, O. Skog, M. Anagandula, O. Korsgren, D. Undlien, M.C. Eike, S.J. Richardson, P. Leete, N.G. Morgan, S. Oikarinen, M. Oikarinen, J.E. Laiho, H. Hyöty, J. Ludvigsson, K.F. Hanssen, K. Dahl-Jørgensen // *Diabetes.* – 2015. – Vol. 64, №5. – P. 1682-1687.
77. Kumar S. Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease / S. Kumar, M. Dikshit // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1-17.
78. Kwiatkowska K. Engagement of spectrin and actin capping of Fc γ RII revealed by studies on permeabilized U937 cells / K. Kwiatkowska, A. Sobota // *Biochem. and biophys. research communications.* – 1999. – 259, № 2. – P. 287 – 293.
79. Kwiatkowska K. Phosphorylation of Fc γ RIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: The role of membrane rafts / K. Kwiatkowska, J. Frey, A. Sobota // *J. Cell Sci.* – 2003. – №116. – P. 537 – 550.
80. Lam C.J. β Cells Persist in T1D Pancreata Without Evidence of Ongoing β -Cell Turnover or Neogenesis / C.J. Lam, D.R. Jacobson, M.M. Rankin, A.R. Cox, J.A. Kushner // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2017. – Vol. 102, №8. – P. 2647-2659.
81. Lau E.Y.M. Type 2 diabetes is associated with the accumulation of senescent T cells / E.Y.M. Lau, E.C. Carroll, L.A. Callender, G.A. Hood, V. Berryman, M. Patrick, S. Finer, G.A. Hitman, G.L. Ackland, S.M. Henson // *Clin. Exp. Immunol.* – 2019. – Vol. 197, №2. – P. 205-213.

82. Leto D. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 / D. Leto, A.R. Saltiel // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2012. – Vol. 13, №6. – P. 383-96.
83. Lim C.K. Isolation and characterization of protoporphyrin glycoconjugates from rat harderian gland by HPLC, capillary electrophoresis and HPLC/electrospray ionization MS / C.K Lim, M.A. Razzaque, J. Luo, P.B. Farmer // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 347, №3. – P. 757-61.
84. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. Lewis Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 123, №1. – P. 265-275.
85. Lu H. Advanced Glycated End Products Alter Neutrophil Effect on Regulation of CD4+ T Cell Differentiation Through Induction of Myeloperoxidase and Neutrophil Elastase Activities / H. Lu, S. Xu, X. Liang, Y Dai, Z Huang, Y Ren, J Lin, X. Liu // *Inflammation.* – 2019. – Vol. 42, №2. – P. 559-571.
86. Lubart R. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity / R. Lubart, M. Eichler, R. Lavi, H. Friedman, A. Shainberg // *Photomed Laser Surg.* – 2005. – Vol. 23, №1. – P. 3-9.
87. Maganti A. From immunobiology to β -cell biology: the changing perspective on type 1 diabetes A. Maganti, C. Evans-Molina, R. Mirmira // *Islets.* – 2014. – Vol. 6, №2. – P. e28778.
88. Maratou E. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells / E. Maratou, G. Dimitriadis, A. Kollias, E. Boutati, V. Lambadiari, P. Mitrou, S.A. Raptis // *Eur J Clin Invest.* – 2007. – Vol. 37, №4. – P. 282-90.
89. Mester E. Die Wirkung der Lasstrahlen auf den Haarwuchs der Maus [The effect of laser beams on the growth of hair in mice] / E. Mester, B. Szende, P. Gärtner // *Radiobiol Radiother (Berl).* – 1968. – Vol. 9, №5. – P. 621-626.

90. Miranda K.M. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite / K.M. Miranda, M.G. Espey, D.A. Wink // Nitric Oxide. – 2001. – Vol. 5, №1. – P. 62-71.
91. Moulahoum H. Aberrant crypt foci are regionally affected by zinc treatment in a 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis model / H. Moulahouma, B.M.A. Boumaza, M. Ferrat, A. Nagy, D.E. Olteanu, A. Bounaama, S. Clichici // J. of Trace Elements in Med. and Biol. – 2018. – Vol. 47. – P. 21-30.
92. Mungrue I.N. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models / I.N. Mungrue, M. Husain, D.J. Stewart // Heart Fail Rev. – 2002 – Vol. 7, №4. – P. 407-22.
93. Nathan C. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species / C. Nathan, A. Cunningham-Bussel // Nat Rev Immunol. – 2013. – Vol. 13, №5. – P. 349-361.
94. Nauck M.A. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? / M.A. Nauck, I. Vardarli, C.F. Deacon, J.J. Holst, J.J. Meier // Diabetologia. – 2011. – Vol. 54, №1. – P. 10-18.
95. Noble J.A. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review / J.A. Noble // J Autoimmun. – 2015. – Vol. 64. – P. 101-112.
96. Obici S. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production / S. Obici, B.B. Zhang, G. Karkanias, L. Rossetti // Nat Med. – 2002. – Vol. 8, №12. – P. 1376-82.
97. Oram R.A. The majority of patients with long-duration type 1 diabetes are insulin microsecretors and have functioning beta cells / R.A. Oram, A.G. Jones, R.E. Besser, B.A. Knight, B.M. Shields, R.J. Brown, A.T. Hattersley, T.J. McDonald // Diabetologia. – 2014. – Vol. 57, №1. – P. 187-191.
98. Piatkiewicz P. Glucose transport in human peripheral blood lymphocytes influenced by type 2 diabetes mellitus / P. Piatkiewicz, A. Czech, J. Tatoń. // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 2007. – Vol. 55, №2. – P. 119-26.

99. Pillay K. Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes / K. Pillay, P. Govender // *Biomed Res Int.* – 2013. – P. 826706.
100. Plaetzer K. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT / K. Plaetzer, T. Kiesslich, B. Kramer, P. Hammerl // *Photochem Photobiol Sci.* – 2002. – Vol. 1, №3. – P. 172-177.
101. Polin R.A., Rowitch D.H., Fox W.W., Abman S.H., Benitz W.E. *Fetal and Neonatal Physiology.* USA: Saunders, 2010. – P. 2108.
102. Pu L.J. Increased blood glycohemoglobin A1c levels lead to overestimation of arterial oxygen saturation by pulse oximetry in patients with type 2 diabetes / L.J. Pu, Y. Shen, L. Lu, R.Y. Zhang, Q. Zhang, W.F. Shen // *Cardiovasc Diabetol.* – 2012. – Vol. 11. – P. 1-6.
103. Putta S. A review on methods of estimation of advanced glycation end products / S. Putta, K. Eswar // *World Journal of Pharmaceutical Research.* – 2015. – Vol. 4, №1. – P. 689-699.
104. Richards J.P. Low O₂-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes is restored by physiological ratios of C-peptide and insulin / J.P. Richards, G.L. Yosten, G.R. Kolar, C.W. Jones, A.H. Stephenson, M.L. Ellsworth, R.S. Sprague // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2014 – Vol. 307, №7. – P. 862-868.
105. Rizvi S.I. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes / S.I. Rizvi, M.A. Zaid, R. Anis, N. Mishra // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2005. – Vol. 32, №1-2. – P. 70-75.
106. Robert Rakel, David Rakel *Textbook of Family Medicine*, 8th Edition. USA: Saunders, 2011. – P. 1205.
107. Roelandts R. The history of phototherapy: something new under the sun? / R. Roelandts // *J Am Acad Dermatol.* – 2002. – Vol. 46, №6. – P. 926-30.
108. Sachar M. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly / M. Sachar, K.E. Anderson, X. Ma // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2016. – Vol. 356, №2. – P. 267-75.

109. Sakaguchi K. Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance / K. Sakaguchi, K. Takeda, M. Maeda, W. Ogawa, T. Sato, S. Okada, Y. Ohnishi, H. Nakajima, A. Kashiwagi // *Diabetol Int.* – 2015. – Vol. 7, №1. – P. 53-58.
110. Sassa S. Microanalysis of erythrocyte protoporphyrin levels by spectrophotometry in the detection of chronic lead intoxication in the subclinical range / S. Sassa, J.L. Granick, S. Granick, A. Kappas, R.D. Levere // *Studies in lead poisoning. I. Biochem Med.* – 1973. – Vol. 8, №1. – P. 135-48.
111. Schmidt A.M. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues / A.M. Schmidt // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38, №1. – P. 1-8.
112. Scivittaro V. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells / V. Scivittaro, M.B. Ganz, M.F. Weiss // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2000. – Vol. 278, №4. P. 676-683.
113. Shah M.S. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes / M.S. Shah, M. Brownlee // *Circ Res.* – 2016. – Vol. 118, №11. – P. 1808-1829.
114. Shui S. Far-infrared therapy for cardiovascular, autoimmune, and other chronic health problems: A systematic review / S. Shui, X. Wang, J.Y. Chiang, L. Zheng // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2015. – Vol. 240, №10. – P. 1257-65.
115. Soongsathitanon J. Proteomic analysis of peripheral blood polymorphonuclear cells (PBMCs) reveals alteration of neutrophil extracellular trap (NET) components in uncontrolled diabetes / J. Soongsathitanon, W. Umsa-Ard, V. Thongboonkerd // *Mol. Cell. Biochem.* – 2019. – Vol. 461. – P. 1–14.
116. Stoika R. In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents / R. Stoika, N. Kashchak, M. Lutsik-Kordovsky, M. Boyko, A. Tsyurulnyk, M. Barska // *Med Sci Monit.* – 2001. – Vol. 7, №4. – P. 652-658.

117. Szablewski L. The structural and functional changes of blood cells and molecular components in diabetes mellitus / L. Szablewski, A. Sulima // *Biol Chem.* – 2017. – Vol. 398, №4. – P. 411-423.
118. Szychowski K.A. TBBPA causes neurotoxic and the apoptotic responses in cultured mouse hippocampal neurons in vitro / K.A. Szychowski, A.K. Wójtowicz // *Pharmacol. Rep.* –2016. – Vol. 68. – P. 20–26.
119. Thomas C.C. Update on diabetes classification / C.C. Thomas, L.H. Philipson // *Med Clin North Am.* – 2015. – Vol. 99, №1. – P. 1-16.
120. Thorens B. Glucose transporters in the 21st Century / B. Thorens, M. Mueckler // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 298, №2. – P. 141-145.
121. Thornalley P.J. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose / P.J. Thornalley; A. Langborg, H.S. Minhas // *Biochem J.* – 1999. – Vol. 344, №1. – P. 109-116.
122. Van Kampen E.J. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives / E. J. van Kampen, W. G. Zijlstra // *Adv. Clin. Chem.* – 1983. – Vol. 23. – P.199–257.
123. Voet D., Voet J.G. *Biochemistry*, 4th Edition. USA: John Wiley & Sons, 2011. – P. 1520.
124. Von Ah Morano A.E. The role of glucose homeostasis on immune function in response to exercise: The impact of low or higher energetic conditions / A.E. Von Ah Morano, G.P. Dorneles, A. Peres, F.S. Lira // *J Cell Physiol.* – 2020. – Vol. 235, №4. – P. 3169-3188.
125. Vrhovac I. Glucose transporters in the mammalian blood cells / I. Vrhovac, D. Breljak, I. Sabolić // *Periodicum biologorum.* – 2014. – Vol. 116, №2. – P. 131-138.
126. Wang H.T. Phototherapy for treating foot ulcers in people with diabetes / H.T. Wang, J.Q. Yuan, B. Zhang, M.L. Dong, C. Mao, D. Hu // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2017. – Vol. 6, №6. – P. 1-43.

127. Whitmarsh J. The Photosynthetic Process. In: Singhal G.S., Renger G., Sopory S.K., Irrgang K.D., Govindjee (eds) Concepts in Photobiology / J. Whitmarsh, Govindjee. – Springer, Dordrecht, 1999. – P. 11-51.
128. Wilding J.P. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors / J.P. Wilding // Metabolism. – 2014. – Vol. 63, №10. – P. 1228-37.
129. Witko-Sarsat V. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia / V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, B. Descamps-Latscha // Kidney Int. – 1996. – Vol. 49, №5. – P. 1304-1313.
130. Xu Y. Study on mechanism of release oxygen by photo-excited hemoglobin in low-level laser therapy / Y. Xu, Y. Lin, S. Gao, J. Shen // Lasers Med Sci. – 2018. – Vol. 33, №1. – P. 135-139.
131. Xu Y. Study on the selection of laser wavelengths in the intravascular low-level laser irradiation therapy / Y. Xu, Y. Lin, S. Gao // Lasers Med Sci. – 2015. – Vol. 30, №4. – P. 1373-6.
132. Yalow R.S. Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects. Determinations by a new sensitive immuno-assay technic / R.S. Yalow, S.A. Berson // Diabetes. – 1960. – Vol. 9. – P. 254-260.
133. Yaribeygi H. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms / H. Yaribeygi, F.R. Farrokhi, A.E. Butler, A. Sahebkar // J Cell Physiol. – 2019. – Vol. 234, №6. – P. 8152-8161.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Кармаш О.І., Люта М.Я., Єфіменко Н.В., Коробов А.М., Сибірна Н.О. / Вплив низькоінтенсивного світлового випромінювання на глікемічний профіль та фізико-хімічні характеристики еритроцитів за умов цукрового діабету у щурів. // Фізіол. Журн. – 2018. Т. 64(6). С. 68-76.
2. Karmash O.I., Liuta M.Ya., Korobov A.M., Sybirna N.O. / Effect of Photomodulation Therapy on Development of Oxidative Stress in Blood Leukocytes of Rats with Streptozocin-Induced Diabetes Mellitus. // Cyt. and Genet. – 2020. Vol. 54 (5). P. 456-464.
3. O. I. Karmash, M. Ya. Liuta, N. V. Yefimenko, N. O. Sybirna / The effect of photobiomodulation therapy on some indices of rats' blood cells functional state under experimental diabetes mellitus. // Biol. Stud. – 2021. Vol. 15(3). P. 3–16.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Люта М. Я. Біологічний ефект дії низькоінтенсивного червоного випромінювання за умов експериментального цукрового діабету / М. Я. Люта, Н. В. Єфіменко, О. І. Кармаш, А. М. Коробов, Н. О. Сибірна // Матеріали XLVII Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів у медицині та біології». – Київ. – 2017. – С. 84-86. *(XLVII Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології», м. Київ, 12-14 жовтня 2017 р., форма участі – заочна)*
2. Кармаш О. Вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання на окремі показники крові щурів за умов експериментального цукрового діабету / О. Кармаш, М. Люта, А. Коробов, Н. Сибірна // Молодь і поступ біології: програма і тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і

- аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (м. Львів, 10 – 12 квітня 2018 р.). – Львів. – 2018. – С. 94-95. (*XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, м. Львів, 10-12 квітня 2018 р., форма участі – очна*)
3. Калінік О. Аналіз змін показників стійкості еритроцитів щурів до дії кислотного гемолітика за умов експериментального цукрового діабету на фоні низькоінтенсивного електромагнітного опромінення. / О. Калінік, О. Кармаш, М. Люта, К. Дудок, А. Коробов, Н. Сибірна. // Молодь і поступ біології: програма і тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (м. Львів, 10 – 12 квітня 2018 р.). – Львів. – 2018. – С. 93-94. (*XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, м. Львів, 10-12 квітня 2018 р., форма участі – заочна*)
 4. Тершак С. Вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання на функціональну активність лейкоцитів щурів за експериментального цукрового діабету / С. Тершак, О. Кармаш, М. Люта, К. Дудок, А. Коробов, Н. Сибірна. // Молодь і поступ біології: програма і тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (м. Львів, 10 – 12 квітня 2018 р.). – Львів. – 2018. – С. 101-102. (*XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, м. Львів, 10-12 квітня 2018 р., форма участі – заочна*)
 5. Karmash O.I. Effect of photobiomodulation therapy on differential white blood cells count and leukocyte antioxidant activity in streptozotocin-induced diabetic rats / O.I. Karmash, M.Y. Liuta, A.M. Korobov, N.O. Sybirna // Materials XLIX International Scientific and Practical Conference

- “Application of Lasers in Medicine and Biology” and “2nd Gamaleia’s Readings”. – Kharkiv. – 2018. – P. 176-178. (*XLIX міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології», м. Харків, 3-7 жовтня 2018 р., форма участі – очна*).
6. Karmash O.I. The influence of photobiomodulation therapy on blood antioxidant system in rats with experimental diabetes mellitus / O.I. Karmash, M.Ya. Liuta, A.M. Korobov, N.O. Sybirna // *Матеріали 50-ої ювілейної Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів у медицині та біології». – Харків. – 2019. – С. 135-136. (50-а ювілейна міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології», м. Харків, 22-25 травня 2019 р., форма участі – заочна)*.
 7. Кармаш О. Ефект фотобіомодуляційної терапії на стан антиоксидантної системи лейкоцитів крові щурів за умов цукрового діабету / О. Кармаш, П. Фоловко, А. Маслакова, М. Люта, А. Коробов, Н. Сибірна // *«Молодь і поступ біології»: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса (м. Львів, 9-11 квітня 2019 р.): збірник тез. — Львів. — 2019. — С. 63-64. (XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса, м. Львів, 9-11 квітня 2019 р., форма участі – очна)*.
 8. Муяссарова К. Вплив низькоінтенсивного червоного випромінювання на показники оксидативного стресу у крові щурів за умов цукрового діабету / К. Муяссарова, О. Кармаш, Н. Єфіменко, М. Люта, А. Коробов, Н. Сибірна // *«Молодь і поступ біології»: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса (м. Львів, 9-11 квітня 2019 р.): збірник тез. — Львів. — 2019. — С. 71-72. (XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 135*

річниці від дня народження Я. Парнаса, м. Львів, 9-11 квітня 2019 р., форма участі – заочна)

9. Кармаш О.І. Антидіабетичний ефект низькоінтенсивної світлової терапії / О.І. Кармаш, М.Я. Люта, А.М. Коробов, Н.О. Сибірна // Медична та клінічна хімія: Матеріали XII українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. – Тернопіль. – 2019. – Т.21. – № 3. – С.190. *(XII український біохімічний конгрес, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., форма участі – очна).*
10. Маслакова А. Вплив фотобіомодуляційної терапії на рівень маркерів оксидативно-нітративного стресу за умов експериментального цукрового діабету / А. Маслакова, П. Фоловко, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27–29 квітня 2020 р. : збірник тез. – Львів, 2020. – С. 28–29. *(XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 27–29 квітня 2020 р., форма участі – заочна).*
11. Муяссарова К. Ефект фотобіомодуляційної терапії на морфофункціональні властивості еритроцитів крові за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету / К. Муяссарова, О. Гіжецька, Н. Єфіменко, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27–29 квітня 2020 р. : збірник тез. – Львів, 2020. – С. 31. *(XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 27–29 квітня 2020 р., форма участі – заочна).*
12. Гіжецька О. Кисеньтранспортна функція гемоглобіну за дії фотобіомодуляційної терапії у разі експериментального цукрового діабету / О. Гіжецька, Н. Єфіменко, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19–21 квітня 2021

- р.). – Львів: ТОВ «Ромусполіграф», 2021. – С. 35-36. (*XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 19–21 квітня 2021 р., форма участі – заочна*).
13. Маслакова А. Вплив фотобіомодуляційної терапії на енергозабезпечення й активність мієлопероксидази лейкоцитів щурів за цукрового діабету / А. Маслакова, О. Кармаш, М. Люта, Н. Сибірна // Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19–21 квітня 2021 р.). – Львів: ТОВ «Ромусполіграф», 2021. – С. 40-41. (*XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 19–21 квітня 2021 р., форма участі – заочна*).
14. Маслакова А.О. Вплив фотобіомодуляційної терапії на розвиток оксидативно-нітративного стресу в еритроцитах та плазмі крові щурів за експериментального цукрового діабету / А.О. Маслакова, О.І. Кармаш, М.Я. Люта, Н.О. Сибірна // Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії: матеріали науково-практичної on-line конференції з міжнародною участю (м. Харків, 01 жовтня 2021 р.). – Харків, 2021. – С. 178–180. (*Науково-практична on-line конференція з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії», м. Харків, 01 жовтня 2021 р., форма участі – заочна*).