

# Вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах за умов цукрового діабету у щурів

І.В. Бродяк, І. І. Біла, Н. О. Сибірна

Львівський національний університет імені Івана Франка; e-mail: iryna\_brodyak@yahoo.com

*Досліджено вплив агматину на агрегаційну здатність лейкоцитів, індуковану сіалоспецифічним лектином зародків пшениці (WGA), і процес полімеризації актинового цитоскелета цих клітин у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЦД) після 0,5, 1 та 3 хв преінкубації лейкоцитів із WGA. Встановлено, що введення агматину тваринам з ЦД призводить до зростання розміру агрегату в 2,7 раза і швидкості агрегації лейкоцитів у 3,2 раза порівняно зі значеннями у тварин з ЦД без введення поліаміну, вказуючи на збільшення кількості сіалоглікокон'югатів і залишків N-ацетил-D-глюкозаміну у складі поверхневих гліканів клітин крові. Слід відмітити, що лейкоцити, які були активовані WGA-стимульовальними сигналами, містять більше полімеризованого актину порівняно як із клітинами контрольних тварин на фоні введення цього поліаміну, так і з лейкоцитами тварин за умов діабету. Отже, введення агматину у разі ЦД зумовлює відновлення афінності зв'язування комплементарних лігандів із сіалоглікокон'югатами з подальшою внутрішньоклітинною трансдукцією лектиніндукованого сигналу, який спричиняє реорганізацію актинового цитоскелета. Ключові слова: полімеризований актин; WGA-індукована агрегація; сіалові кислоти; лейкоцити; агматин; експериментальний цукровий діабет.*

## ВСТУП

Стрептозототиніндукований цукровий діабет (ЦД) у щурів супроводжується втратою маси, полідипсією, поліурією, глюкозурією, поліфагією, гіпоінсулінемією, гіперглікемією та багатьма іншими метаболічними змінами [1, 2]. Серед усіх клітин організму клітини крові мають особливий інтерес у зв'язку з тим, що вони безпосередньо зазнають впливу підвищеної концентрації глюкози, а кількість O-GlcNAc-глікозильованих білків на їхній поверхні є чутливим індикатором рівня гіперглікемії [3]. У разі введення тваринам з ЦД агматину спостерігається нормалізація вмісту глюкози в крові [4]. За хімічною природою агматин є поліаміном, продуктом декарбоксілювання L-аргініну, який за фізіологічних умов у незначних кількостях синтезується в організмі. Одним із біологічних ефектів агматину, що

реалізуються рецепторопосередкованим способом, є здатність впливати на метаболізм глюкози за умов її підвищеної концентрації [5, 6]. Гіперглікемія у разі діабету викликає порушення вуглеводного обміну й утворення кінцевих продуктів глікозилювання – AGEs (з англ. advanced glycation end products), що призводить до зміни експресії генів і активності клітинних глікозилтрансфераз і глікозидаз – ензимів синтезу глікокон'югатів [7]. Останні відіграють важливу роль у різних біологічних процесах, зокрема, гомеостазі глюкози, контролі якості білків, запаленні, міжклітинному сигналюванні та клітинній адгезії. Наявність змінених вуглеводних детермінант модифікує біологічну активність глікокон'югатів. Взаємодія модифікованого ліганду з його специфічним рецептором призводить до порушень на рівні трансмембранного і внутрішньоклітинного сигналювання [8, 9].

Важливою характеристикою прояву функ-

ціональної активності лейкоцитів є їхній вихід із судин (діapedез) в місця, де відбувається розвиток інфекції [10]. Для того щоб проникнути крізь судинну стінку, лейкоцити первинно взаємодіють з ендотелієм, перекочуються по його поверхні, зазнають щільної адгезії, розпластуються і, нарешті, переміщуються крізь або між ендотеліальними клітинами кровоносної судини [11-13]. В адгезивних взаємодіях лейкоцитів з ендотеліоцитами безпосередню участь беруть L-, E- і P-селектини [14, 15].

Лейкоцитарний L-селектин і глікопротеїновий ліганд-1 для P-селектину (PSGL-1) є не лише адгезивними молекулами, але і сигнальними рецепторами, які зумовлюють реорганізацію цитоскелета. Взаємодія їх з комплементарними лігандами (E- і P-селектинами) на поверхні ендотеліоцитів, а також інтегрину LFA-1 (з англ. Lymphocyte Function-associated Antigen 1) з імуноглобуліноподібним рецептором ендотеліальних клітин ICAM-3 (з англ. Intercellular Adhesion Molecule 3), призводить до активації ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кінази) [16]. Інтактні інозитолфосфоліпіди плазматичної мембрани лейкоцитів відіграють важливу роль у реорганізації цитоскелета, зокрема, фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат з'єднується з широким діапазоном різних АВР (з англ. actin-binding proteins), що сприяє полімеризації актину [1, 14, 17]. Отже, перерозподіл на поверхні лейкоцитів сіалоглікокон'югатів і встановлення взаємозв'язку із внутрішньоклітинними сигнальними молекулами і, особливо, АВР, впливає на функціональну активність лейкоцитів [18, 19].

Метою нашої роботи було дослідити вплив агматину на агрегаційну здатність лейкоцитів, індуковану лектином зародків пшениці (WGA), і процес полімеризації актину за умов 0,5, 1 та 3-хвилинної преактивації лейкоцитів інкубацією із сіалоспецифічним лектином WGA у нормі та за умов ЦД.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях масою 150-180 г згідно з національними "Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986). Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води і перебування у стандартних умовах віварію.

Тварини були поділені на 4 групи: 1-ша – контроль, 2-га – контрольні тварини, яким вводили агматин, 3-тя – тварини з модельним ЦД, 4-та – тварини з діабетом, яким вводили агматин. Експериментальний ЦД викликали внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину ("Sigma", США), розчиненого в 10 ммоль/л цитратному буфері (рН 5,5), з розрахунку 60 мг на 1 кг маси тіла. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові через 72 год після введення стрептозотоцину. Концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Україна). В експерименті використовували тварин із вмістом глюкози  $\geq 14$  ммоль/л. Тваринам 2-ї і 4-ї груп, починаючи з 3-ї доби від моменту індукції діабету, внутрішньом'язово вводили агматин ("Sigma", США), розчинений у фізіологічному розчині, у концентрації 20 мг/кг упродовж 14 діб. Тоді як тваринам 1-ї та 3-ї груп протягом 14 діб внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин. Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 15-ту добу експерименту. Збір крові для досліджень проводили з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100).

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини фікол-тріомбразу

( $\rho=1,076-1,078 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ ) центрифугуванням при 630 г продовж 35 хв [20]. Отримані клітини двічі відмивали у забуференому  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  фізіологічному розчині (ЗФР, рН 7,4) впродовж 5 хв при 850 г. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім становила не менше ніж 98%. Для оцінки локалізації та визначення вмісту (за інтенсивністю свічення) F-актину в лейкоцитах проводили попереднє активування цих клітин преінкубацією з лектином WGA впродовж 0,5, 1 і 3 хв.

Агрегаційну здатність лейкоцитів вивчали турбідиметричним методом [10] за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації "LA 230" (НВФ "БИОЛА", Росія) в суспензії відмитих лейкоцитів ( $4,2 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл) у разі перемішування зі швидкістю 800 об/хв і 37°C. На аналітичному етапі визначали показники агрегації за кривою світлопропускання: ступінь агрегації – максимальний її відсоток, що відповідає приросту світлопропускання суспензії після внесення індуктора (виражали у відсотках); швидкості агрегації – збільшення відсотка агрегації за 1 хв на найбільш лінійній ділянці (виражали у відсотках за 1 хв). Розмір агрегату визначали як максимальне значення його середнього розміру після додавання індуктора (виражали в умовних одиницях). Як індуктор агрегації використовували лектин WGA ("Sigma", США) у концентрації 10 мкг/мл. Цей лектин взаємодіє з залишками сіалових кислот, які наявні в термінальних позиціях N-зв'язаних глікопротеїнів, а також із залишками сіалових кислот і N-ацетил- $\beta$ ,D-глюкозаміну в складі O-гліканів глікопротеїнів і гліколіпідів [10].

Для дослідження рівня полімеризації актину використовували відмиті лейкоцити, які наносили на предметне скло у кількості 100 000 клітин на одну краплю. Спочатку клітини фіксували 4 %-м параформальдегідом (без метанолу), який готували на ЗФР<sup>+</sup> (KCl – 200 мг/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 200 мг/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,16 г/л, NaCl – 8 г/л,  $\text{CaCl}_2$  – 0,1 г/л,

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,1 г/л; рН 7,5) впродовж 10 хв при 4°C, а потім 20 хв при 20°C. Після фіксування клітини тричі промивали ЗФР<sup>+</sup> та інкубували у 50 ммоль/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /ЗФР<sup>+</sup> впродовж 5 хв при 20°C і знову відмивали ЗФР<sup>+</sup>. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,03 %-м розчином Тритону X-100 в ЗФР<sup>+</sup> (5 хв, 0°C), після чого тричі відмивали 0,2 %-м розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА), який готували на тріс-НСІ-буфері (ТБС: 2,5 ммоль/л HCl, 13 ммоль/л NaCl, рН 7,4). Клітини блокували у 3 %-му розчині БСА/ТБС впродовж 30 хв при 20°C. Для візуалізації F-актину клітини інкубували 1 год при 20°C з розведеним Phalloidin Alexa Fluor 350 ("Invitrogen", США) у ЗФР<sup>+</sup>. Після цього їх знову відмивали у 0,2 %-му розчині БСА/ТБС (5 разів по 5 хв) та у ТБС. Зразки покривали середовищем для заливу, що містив DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octan) і розглядали під флуоресцентним мікроскопом (Nikon Optiphot 2), використовуючи комбінацію фільтрів UV2A. Оцифрування результатів інтенсивності сигналів флуоресцентної мікроскопії на знімках проводили за допомогою програми Image J і представляли як середнє арифметичне значення інтенсивності свічення однієї клітини, яке виражали в умовних одиницях. Репрезентативні фотографії представляють середнє значення інтенсивності сигналів, обчислене для кожної групи (n = 5-6).

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програми "Excel-2003" для Windows і представляли у вигляді  $M \pm m$ . Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей результатів вираховували критерій t Стьюдента. Значення  $P < 0,05$  вважали статистично вірогідними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов ЦД у разі використання як індуктора лектину WGA ступінь і швидкість агрегації лейкоцитів зростали в 2,0 та 2,4 раза відпо-

відно порівняно зі значеннями у контрольній групі (рис. 1, таблиця). Це свідчить про синтез гідридних типів N-гліканів за участю активованого GnTIII-ензиму та незавершеність процесу глікозилювання білків і ліпідів [10]. Як наслідок на поверхні лейкоцитів експонуються глікокон'югати з термінальними N-ацетил- $\beta$ ,D-глюкозаміновими залишками [21], які й зумовлюють високі показники WGA-індукованої агрегації. Всі ці зміни у структурі вуглеводної частини гліканів плазматичної мембрани лейкоцитів за умов діабету призводять до порушення сприйняття молекулярних сигналів із мікрооточення та впливають на характер їхньої взаємодії з іншими циркулюючими клітинами крові й ендотелієм судин [3, 10].

Введення агматину контрольним щурам і тваринам з ЦД спричиняло зростання розміру агрегату, швидкості та ступеня WGA-індукованої агрегації лейкоцитів порівняно з відповідними групами тварин без введення цього поліаміну (див. рис. 1, таблицю). Ми припускаємо, що високі показники агрегації лейкоцитів після введення агматину контрольним тваринам зумовлені комплементарним зв'язуванням

цього лектину із залишками N-ацетил- $\beta$ ,D-глюкозаміну. Сіалова кислота, її  $\alpha$ - і  $\beta$ -кетозота сіаліллактозопохідні, а також метильовані ефіри N-ацетилнейрамінової кислоти розпізнаються лектином WGA, але їхня афінність у 4 рази нижча, ніж його спорідненість до N-ацетил-D-глюкозаміну [10]. Окрім того, у цій групі тварин у відповідь на введення агматину на поверхні лейкоцитів знижується кількість сіаловмісних глікокон'югатів [21], що спричинено порушенням синтезу комплексного типу N-гліканів [10]. Тоді як зростання показників WGA-індукованої агрегаційної здатності лейкоцитів (див. рис. 1, таблицю) у тварин з ЦД на фоні введення агматину зумовлені як збільшенням кількості  $\alpha$ 2,3-зв'язаних залишків сіалових кислот, так і залишків N-ацетил-D-глюкозаміну у складі поверхневих гліканів цих клітин крові [21].

Трансдукція лектиніндукованого сигналу через глікокон'югати, кількість і структура яких на поверхневі лейкоцитів за умов діабету є зміненою [21], призводить до порушень у процесах полімеризації-деполімеризації актинового цитоскелета [22]. Введення агматину тваринам з ЦД зумовлює збільшення кількості сіалоглікокон'югатів і залишків N-ацетил-D-глюкозаміну у складі поверхневих гліканів лейкоцитів, внаслідок чого відновлюється афінність зв'язування лектину WGA з його комплементарними лігандами. Тому наступним нашим завданням було дослідити вплив агматину на динаміку полімеризації актину у WGA-стимульованих лейкоцитах контрольних тварин і за умов ЦД.

Провівши порівняльний аналіз динаміки полімеризації актину в лейкоцитах у стані спокою та активації, було встановлено, що у контрольній групі тварин ці клі-

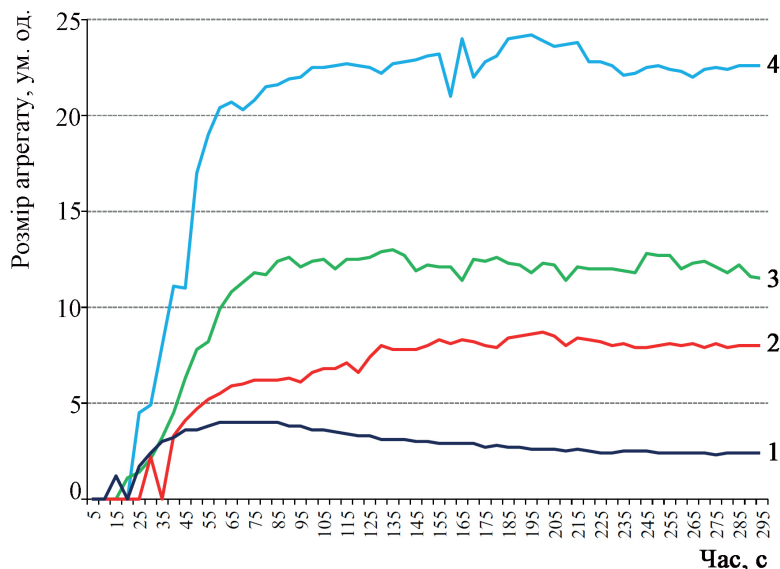


Рис. 1. Типові криві WGA-індукованої агрегації лейкоцитів щурів у контрольній групі, за умов експериментального цукрового діабету (ЦД) та на фоні введення агматину: 1 – контроль; 2 – ЦД; 3 – контроль і агматин; 4 – ЦД і агматин

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

Показники	Контроль	ЦД	Контроль і агматин	ЦД і агматин
Розмір агрегату, ум. од.	4,1 ± 0,5	8,7 ± 0,9*	12,9 ± 1,5*	24,0 ± 2,6**
Ступінь агрегації, %	21,8 ± 2,5	43,0 ± 3,7*	49,5 ± 4,5*	60,2 ± 4,9**
Швидкість агрегації, %/хв	4,3 ± 0,75	10,5 ± 1,9*	29,7 ± 3,1*	34,3 ± 2,9**

\*  $P < 0,05$  відносно контролю, \*\*  $P < 0,05$  щодо значень у тварин з ЦД без введення агматину

тини мають перехідний рівень F-актину, який досяг максимуму на 1-й хвилині стимулювання сіалоспецифічним лектином WGA і потім швидко зменшився до вихідного значення (рис. 2 і 3). Це свідчить про те, що лектин WGA зв'язується з комплементарними поверхневими глікокон'югатами і спрацьовує система трансдукції сигналу від мембрани до цитоплазматичних білків та відбувається реорганізація актину [23]. Ремоделювання актинової складової цитоскелета зумовлює трансформацію клітин від майже сферичної, у стані спокою, в поляризовану асиметричну форму. Така морфологічна поляризація характеризується появою багатих на актин ламелоподій на передньому кінці і хвостових структур з протилежного боку клітини [17].

На фоні введення агматину у лейкоцитах контрольної групи тварин відсоток F-актину становив  $350 \pm 41$ ,  $400 \pm 46$  і  $320 \pm 31$  на 0,5, 1 і 3-тю хвилини стимулювання сіалоспецифічним лектином WGA відповідно (див. рис. 3). Така динаміка полімеризації актину вказує на формування піка F-актину на 1-шу хвилину стимулювання лектином WGA. Високі значення F-актину на 3-й хвилині після дії лектину WGA (див. рис. 3) свідчать про порушення процесу його деполімеризації. Ми спостерігаємо нетипово пролонгований час поліме-

ризації. Такі зміни, можливо, зумовлені порушенням трансдукції сигналу через сіалоглікокон'югати, які у термінальних

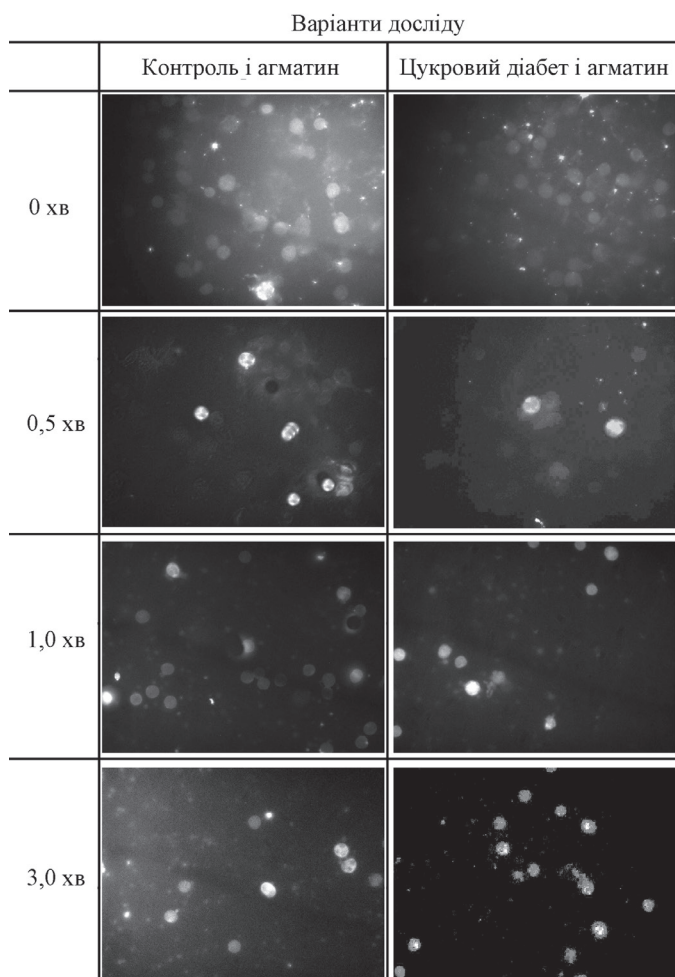


Рис. 2. Інтенсивність свічення актину після фіксування, пермеабілізування й інкубування лейкоцитів з Phalloidin Alexa Fluor 350 у контрольній групі тварин і за умов цукрового діабету (ЦД) на фоні введення агматину. Збільшення у 1 000 разів

позиціях містять меншу кількість  $\alpha 2,3$ -зв'язаних залишків сіалових кислот. Адже, як було встановлено нами раніше [21], у разі введенні агматину контрольним тваринам на поверхні лейкоцитів знижується рівень експонування  $\alpha 2,3$ -сіаловмісних глікокон'югатів на фоні незмінного вмісту сіалових кислот, приєднаних  $\alpha 2,6$ -глікозидним зв'язком. Найчастіше зниження вмісту сіалових кислот у складі глікокаліксу клітин зумовлене посиленням процесу десіалювання мембранних глікокон'югатів. Варто зазначити, що сіалові кислоти, які приєднані  $\alpha 2,3$ -глікозидним зв'язком до субтермінальних цукрів у структурі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів, набагато швидше піддаються гідролітичному відщепленню за участі сіалідаз, ніж  $\alpha 2,6$ -зв'язані залишки цих цукрів. Іншою причиною втрати сіалових кислот з поверхні клітин може бути відщеплення від глікопротеїнів олігосахаридних фрагментів, які є сіалюваними, чи злушування цілих молекул сіаловмісних глікопротеїнів. Однак часто всіх ці фактори поєднуються [10].

У лейкоцитах тварин за умов ЦД низька амплітуда полімеризації актину (див. рис. 3)

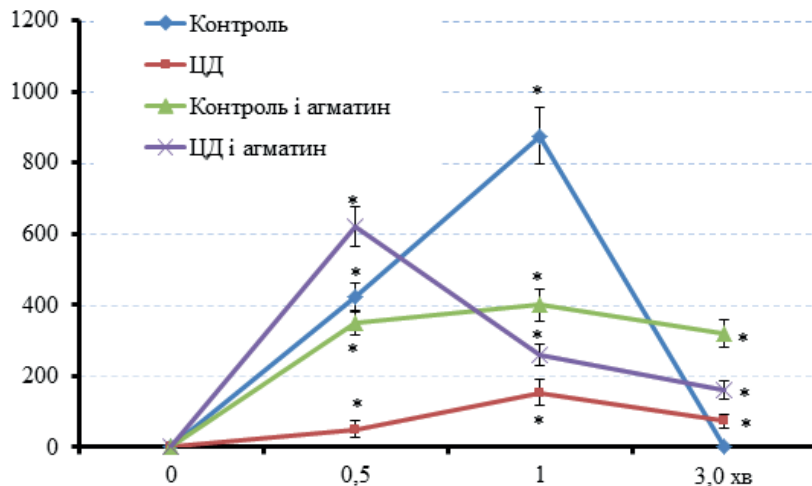


Рис. 3. Динаміка полімеризації актину в лейкоцитах у стані спокою (0 хв) і у стані активації (після преінкубації із сіалоспецифічним лектином WGA впродовж 0,5, 1 і 3 хв) контрольних тварин і щурів з цукровим діабетом (ЦД) на фоні введення агматину. Часові точки вказують відсоток F-актину відносно його вмісту в лейкоцитах у стані спокою, який прийнято за 0%.  $P < 0,05$  відносно лейкоцитів у стані спокою

вказує на довготривале несприйняття активаційних сигналів від лектину WGA через сіаловмісні глікокон'югати. У разі діабету підвищений вміст глюкози всередині клітин виявляє інгібувальну дію на ензими, які задіяні у біосинтезі олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів [9]. Одним з таким ензимів є сіалілтрансфераза, яка каталізує приєднання сіалової кислоти до субтермінального цукру у структурі глікану [10].

На відміну від цього, в групі тварин з ЦД на фоні введення агматину відсоток F-актину становив  $620 \pm 59$ ,  $260 \pm 28$  і  $160 \pm 15$  на 0,5, 1 і 3-тю хвилини після преінкубації лейкоцитів з сіалоспецифічним лектином WGA відповідно (див. рис. 2 і 3). Така динаміка формування піка полімеризації актину вже на 0,5-ту хвилину стимулювання лектином WGA і дуже стрімкий процес деполімеризації на 1-шу хвилину після дії лектину (див. рис. 3) вказують на те, що основний вклад у процес трансдукції сигналу зумовлений олігосахаридними ланцюгами глікокон'югатів, які у термінальній позиції містять саме  $\alpha 2,3$ -зв'язані залишки сіалових кислот. Адже у лейкоцитах тварин з ЦД на фоні введення агматину у структурі гліканових епітопів збільшується кількість лише  $\alpha 2,3$ -сіаловмісних глікокон'югатів [21].

Ймовірно, нормалізація вмісту глюкози у тварин з діабетом за умов введення агматину [4] є одним з механізмів, який опосередковує відновлення рівноваги  $\alpha 2,3$ -сіалювання гліканового профілю лейкоцитів, що сприяє підтриманню довготривалої відповіді клітин на активаційні сигнали. Цей своєрідний біологічний ефект узгоджується із зняттям

стану преактивованості лейкоцитів після введення агматину [24] і відновленням афінності зв'язування комплементарних лігандів із сіалоглікокон'югатами та трансдукцією лектиніндукованого сигналу, який зумовлює реорганізацію актинового цитоскелета.

**И.В. Бродяк, И.И. Биля, Н.О. Сибирная**

### **ВЛИЯНИЕ АГМАТИНА НА ДИНАМИКУ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА В WGA-СТИМУЛИРОВАННЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС**

Исследовано влияние агматина на агрегационную способность лейкоцитов, индуцированную сиаоспецифичным лектином зародышей пшеницы (WGA), и процесс полимеризации актинового цитоскелета этих клеток в норме и в условиях экспериментального сахарного диабета (СД) после 0,5, 1 и 3 мин преинкубации лейкоцитов с WGA. Выявлено, что введение агматина животным с СД приводит к росту размера агрегата в 2,7 раза и скорости агрегации лейкоцитов в 3,2 раза по сравнению со значениями у животных с СД без введения полиамина, указывающие на увеличение количества сиаогликоконъюгатов и остатков N-ацетил-D-глюкозамина в составе поверхностных гликанов клеток крови. Следует отметить, что лейкоциты, которые были активированы WGA-стимулирующими сигналами, содержат больше полимеризованного актина по сравнению как с клетками контрольных животных на фоне введения этого полиамина, так и с лейкоцитами животных в условиях диабета. Таким образом, в случае СД введение агматина обуславливает восстановление аффиности связывания комплементарных лигандов с сиаогликоконъюгатами с последующей внутриклеточной трансдукцией лектининдуцированного сигнала, который вызывает реорганизацию актинового цитоскелета. Ключевые слова: полимеризованный актин; WGA-индуцированная агрегация; сиаовые кислоты; лейкоциты; агматин; экспериментальный сахарный диабет.

**I.V. Brodyak, I.I. Bila, N.O. Sybirna**

### **EFFECT OF AGMATINE ON ACTIN POLYMERIZATION DYNAMICS IN WGA-STIMULATED LEUKOCYTES UNDER DIABETES MELLITUS IN RATS**

We examined the effect of agmatine on the aggregation ability of white blood cells induced by sialospecific lectin of wheat germ (WGA) and the process of polymerization of actin cytoskeleton of leukocytes in normal conditions and under conditions of experimental diabetes mellitus (DM) after 0.5, 1

and 3 min of preincubation of these cells with the WGA. Our studies revealed that agmatine administration to animals with DM leading to a 2.7- and 3.2-fold increase of the aggregate size and aggregation velocity of leukocytes, respectively, compared to diabetic rats who did not receive this polyamine injections. The achieved results can testify to the increase of sialoglycoconjugates and N-acetyl-D-glucosaminecontaining glycans on leukocyte surface. The leukocytes of animals with DM introduced on the background of agmatine insertion that were activated by WGA-stimulatory signals contain more polymerized actin in comparison with the cells of control animals on the background of this polyamine insertion as with leukocytes of animals with DM. Our data suggest that under conditions of DM the agmatine insertion makes the recovery of affinity binding of complementary ligands with sialoglycoconjugates with subsequent intracellular transduction of lectin-induced signal which causes the reorganization of the actin cytoskeleton in leukocytes.

*Key words:* polymerised actin; WGA-induced aggregation; sialic acid; leukocytes; agmatine; experimental diabetes mellitus.

*Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;  
e-mail: iryna\_brodyak@yahoo.com*

### **REFERENCES**

1. Badr G, Bashandy S, Ebaid H, Mohany M, Sayed D. Vitamin C supplementation reconstitutes polyfunctional T cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Nutr.* 2012;51:623-33.
2. Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature Rev Immun.* 2010;10:501-13. doi:10.1038/nri2787.
3. Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics.* 2013; 10(4): 365-80.
4. Ferents IV, Brodyak IV, Lyuta MYa, Burda V A, Gavrylyshyn GS, Sybirna NO. Effect of agmatine on the blood system parameters of rats under the condition of experimental diabetes mellitus. *Studia Biologica.* 2012;6(3):65-72. [Ukrainian].
5. Hwang SL, Liu IM, Tzeng TF, Cheng JT. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia.* 2005;48(4):767-75.
6. Piletz JE, Aricioglu F, Cheng J-T, Fairbanks CA, Gilad VH, Haenisch B, et al. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discov Today.* 2013;18(17-18):880-893.
7. Lee C-L, Chiu PCN, Pang P-C, Chu IK, Lee K-F, Koistinen R, et al. Glycosylation Failure Extends to Glycoproteins in Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2011;60:909-17.
8. Gloster TM, Vocadlo DJ. Developing inhibitors of glycan processing enzymes as tools for enabling glycobiology. *Nature Chem Biol.* 2012;8:683-94.
9. Liu K, Liu HY, Ye W, Jiang JH, Xu X. The initial investigation of the expression of glycosyltransferases

- in the retina of streptomycin diabetic rats. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2010;46(7):580-4.
10. Sybirna NO, Shevtsova AI, Ushakova GO, Brodyak IV, Pismenetzka IY. *Fundamentals of glycobiology. Monograph*; Lviv: Ivan Franko National University of Lviv; 2015. [Ukrainian].
  11. Mocsai A, Walzog B, Lowell CA. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc Res*. 2015; 107(3):373-85.
  12. Scott DW, Patel RP. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology*. 2013;23(6):622-33.
  13. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature*. 2015;15:692-704.
  14. Green CE, Pearson DN, Camphausen RT, Staunton DE, Simon SI. Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity 2-integrin on neutrophils. *J Immunol*. 2004;172:7780-90.
  15. Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature*. 2016;16:378-91.
  16. Luo J, Xu T, Wang X, Ba X, Feng X, Deepak V, et al. PI3K is involved in L-selectin- and PSGL-1-mediated neutrophil rolling on E-selectin via F-actin redistribution and assembly. *J Cell Biochem*. 2010;110(4):910-9.
  17. Fenteany G, Glogauer M. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol*. 2003;11:15-24.
  18. Alonso-Lebrero JL, Serrador JM, Domínguez-Jiménez C, Barreiro O, Luque A, del Pozo MA, et al. Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood*. 2000;95(7):2413-9.
  19. Lin W-L, Guu S-Y, Tsai C-C, Prakash E, Viswaraman M, Chen H-B, et al. Derivation of cinnamon blocks leukocyte attachment by interacting with sialosides. *PLoS ONE*. 2015; 10(6):e0130389. doi:10.1371/journal.pone.0130389.
  20. Lapovets LE, Lutsyk BD. *Handbook of Laboratory Immunology*, Lviv, 2002. [Ukrainian].
  21. Ferents I, Brodyak I, Lyuta M, Klymyshyn N, Burda V, Sybirna N. Sialylation status of leukocyte cell-surface glycoconjugates in streptozotocin-induced diabetic rats and after treatment with agmatine. *Curr Issues Pharmacy and Med Sci*. 2013;26(4):390-2.
  22. Brodyak IV, Bila II, Sybirna NO. Influence of WGA-stimulatory signals on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visnyk of Lviv University. Biol ser*. 2016; 73:35-40. [Ukrainian].
  23. Carulli G, Mattii L, Azzarà A, Brizzi S, Galimberti S, Zucca A, et al. Actin polymerization in neutrophils from donors of peripheral blood stem cells: divergent effects of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Hematol*. 2006;81(5):318-23.
  24. Brodyak IV, Bila II, Overchuk M, Sybirna NO. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Studia Biologica*. 2014;8(3-4):17-30.

*Матеріал надійшов до редакції 25.02. 2017*