

ПРИГНІЧУЮЧА ДІЯ АГМАТИНУ НА ГЕНЕТИЧНО ЗАПРОГРАМОВАНУ ЗАГИБЕЛЬ ЛЕЙКОЦИТІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

І.В. ФЕРЕНЦ^{1,2}, І.В. БРОДЯК¹, М.Я. ЛЮТА¹, В.А. БУРДА¹, Н.О. СИБІРНА¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка
E-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

² Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Київ

Проведено дослідження впливу агматину на ступінь апоптичних змін у лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД). У разі діабету виявлено зростання кількості лейкоцитів як з ранніми, так і пізніми ознаками апоптозу. В лейкоцитах хворих тварин зростає вміст фрагментованої ДНК, збільшується апоптичний індекс, порушується кількісне співвідношення протеїнів—регуляторів апоптозу (p53 і Bcl-2). Агматин виявляє прямі коригуючі ефекти на процеси апоптозу лейкоцитів: нормалізувався вміст протеїнів p53 і Bcl-2, знижувався апоптичний індекс, послаблювався процес деградації ядерної ДНК, а також зменшувалася кількість клітин з ранніми і пізніми ознаками апоптозу.

Ключові слова: агматин, апоптоз, лейкоцити, експериментальний цукровий діабет.

Вступ. Запрограмована смерть клітини (апоптоз) відіграє важливу роль у забезпеченні імунної відповіді організму, оскільки є визначальною в процесах селекції, регуляції чисельності й елімінації відпрацьованих, пошкоджених і неспецифічно активованих клітин крові [1]. Таким шляхом регулюється відповідь імунокомпетентних клітин на антигенні стимули, визначається характер, динаміка і тривалість імунної відповіді, формування імунологічної толерантності [2]. Контрольований апоптоз розглядається сьогодні як головний механізм підтримки оптимального балансу клітин у вогнищі запалення, що обмежує експансію активованих клонів і перешкоджає розвитку аутоімунних реакцій [3].

В нормі більшість клітин імунної системи мають коротку тривалість життя: менше одного дня — для нейтрофілів, декілька тижнів або місяців — для моноцитів і лімфоцитів. Однак розвиток ряду захворювань індукує порушення у функціонуванні цих клітин крові, що створює необхідність ефективного контролю за їхньою

вчасною елімінацією. До таких захворювань належить і цукровий діабет (ЦД) [2, 3].

ЦД 1-го типу виникає як результат селективного аутоімунного руйнування β-клітин підшлункової залози з наступним розвитком інсулінової недостатності й порушенням гомеостазу глюкози. В міру прогресування захворювання зміни у метаболізмі головного енергетичного субстрату організму зачіпають всі ланки обміну речовин. Надалі порушення метаболічного характеру поступово приводять до якісних і кількісних змін інших внутрішньоклітинних процесів. Навіть короточасне підвищення концентрації глюкози ініціює активацію ряду патологічних процесів, таких як оксидативний стрес, глікозилювання білків, підвищення активності протеїнкази С, активація шляхів утворення гексозамінів і поліолів та ін. [4]. На клітинному рівні це може проявлятися зміною морфологічних і функціональних параметрів, що у випадку імунокомпетентних клітин пов'язане з індукцією порушень у процесах забезпечення імунної відповіді організму. Так, за умов ЦД нейтрофіли можуть неадекватно реагувати на сигнали хемотаксису і мають низьку бактерицидну активність, характеризуються надмірним синтезом лейкотрієнів, секрецією лізосомальних ферментів, зміною базального рівня внутрішньоклітинного кальцію, аномальною продукцією супероксид-аніону. У разі взаємодії останнього з молекулою оксиду азоту у клітині утворюється потужний оксидант — пероксинітрил [5, 6].

З розвитком оксидативно-нітративного стресу у клітинах безпосередньо пов'язана активація програмованої клітинної загибелі. Активні форми кисню й азоту безпосередньо або через внутрішньоклітинні редокс-залежні сигнал-передавальні системи стимулюють фосфорилування білків-мішеней, що залучені в регулювання різних шляхів ініціації апоптичної про-

© І.В. ФЕРЕНЦ, І.В. БРОДЯК, М.Я. ЛЮТА,
В.А. БУРДА, Н.О. СИБІРНА, 2016

грами: через активацію генетичних механізмів, мітохондріальним шляхом, через рецептори в цитоплазмі, а також через рецептори CD95 (Fas/APO1) на плазмалемі [7].

З розвитком оксидативно-нітративного стресу у клітинах безпосередньо пов'язана активація програмованої клітинної загибелі через p53-залежний шлях. Білок p53 впливає як на зовнішній (рецепторний), так і на мітохондріальний шлях індукції апоптозу. До мішеней білка p53 належать гени, що кодують білки p21, GADD45, 14-3-3-сигма, Вах, Puma, Noxa, Araf-1, Fas-R, DR5, які він активує, та гени білків Bcl-2 і Bcl-xL, на які p53 має інгібувальний вплив. Білок p53 також підвищує експресію «рецепторів загибелі» (Fas-R та ін.), деяких цитоплазматичних білків, що містять «домени смерті», наприклад, PIDD – p53-induced protein with a death domain (p53-індукований білок із доменом загибелі). Крім цього, білок p53 збільшує вміст білка Araf-1, який бере участь в активації апоптосоми і каспази-6, що специфічно розщеплює ядерні ламіни в процесі руйнування ядерної оболонки. Існує й інший шлях апоптозу за участі білка p53, який не залежить від транскрипції генів. При цьому значений білок транслокується до мітохондрій, де взаємодіє з Bcl-xL, викликаючи зміну проникності мітохондріальної мембрани і вивільнення цитохрому *c* та інших проапоптичних білків. Протеїн p53 може індукувати апоптоз лізосомально-мітохондріальним шляхом, ініційованим лізосомальною дестабілізацією. Розрив лізосом є найбільш ранньою подією p53-залежного апоптозу, і подальша активація каспаз може відбуватися ферментами, вивільненими із лізосом [8–14].

Апоптоз, який запускається на рівні мітохондрій, контролюється родиною білків Bcl-2, які поділяються на антиапоптичні, дія яких спрямована на зниження проникності мітохондріальної мембрани, та проапоптичні, що, навпаки, стимулюють вивільнення цитохрому *c*. До останніх належить протеїн Bcl-2 [15]. Антиапоптичний протеїн Bcl-2, впливаючи на виживання змінених клітин, інгібує p53-залежний і p53-незалежний шляхи апоптозу [14]. Окрім його канонічної антиапоптичної ролі, Bcl-2 проявляє інгібувальний ефект на клітинний цикл. Bcl-2 функціонує в двох різ-

них внутрішньоклітинних компартментах – мітохондрії й ендоплазматичному ретикулумі. В ендоплазматичному ретикулумі Bcl-2 модулює Ca²⁺-залежні сигнальні мережі, що збільшує стійкість клітин до апоптозу та пригнічує проліферацію. В мітохондрії Bcl-2 та інші антиапоптичні члени цієї родини функціонують, регулюючи іонний потік і стабілізуючи мембранний потенціал, регулюючи вивільнення цитохрому *c*, зв'язуючи й інгібуючи проапоптичні члени родини, а також Araf-1, інгібуючи перекисне окиснення ліпідів, впливаючи на кальцієвий гомеостаз і швидкість гідролізу АТФ [16, 17]. Надмірний вміст Bcl-2 гальмує апоптоз, ініційований *c*-Мус та p53, через зниження вмісту в клітинах цих білків. Проте за умов підвищення активності p53 інгібується експресія генів *mys* і *bcl-2*. Крім того, Bcl-2 може взаємодіяти з Вах – проапоптичним членом родини – і зв'язувати його, запобігаючи утворенню в зовнішній мітохондріальній мембрані пор і виходу з мітохондрій проапоптичних факторів. Отже, зростання експресії *bcl-2* може стати причиною резистентності до різного роду терапії [7].

За певних умов апоптичні механізми здатні попереджати розвиток некрозу. Прикладом може бути процес мітоптозу – програмованої загибелі окремих мітохондрій в клітині. Мітохондрія, яка продукує надлишкову кількість активних форм кисню, може еліминуватися шляхом формування апоптосоми – комплексу із каспаз та інших протеолітичних ферментів. Мітохондрія містить широкий спектр білків (AIF, ендонуклеаза G, цитохром *c*) і небілкових факторів (іони Ca, активні форми кисню), які активують процес клітинної загибелі шляхом апоптозу після їхнього надходження у цитоплазму через велику кількість відкритих мітохондріальних пор. Процес формування мітохондріальних апоптичних пор перебуває під контролем різних регуляторних систем клітини. Перешкоджають цьому процесу представники родини Bcl-2, які нейтралізують дію індукторів апоптозу. Встановлено, що BNip3 і активна полі(АДФ-рибоза)полімераза-1 індукують відкриття пор на мітохондріях, що супроводжується зниженням мітохондріального потенціалу і збільшенням продукції активних форм кисню. Утворені вільні радикали разом з іонами Ca

дестабілізують мітохондріальну мембрану шляхом активації перекисного окиснення ліпідів або ліполізу за участі фосфоліпази А2. Такі зміни на рівні мітохондрій призводять до запуску генетично запрограмованої загибелі [18, 19].

Для розпізнавання апоптичних клітин існують ряд методів, які базуються на виявленні морфологічних, біохімічних, молекулярних ознак апоптозу. Дегенеративні зміни у ядрі та цитоплазмі клітин можна зафіксувати за допомогою світлової мікроскопії цитологічних препаратів з використанням звичайних методів фіксації і фарбування або способів, які селективно виявляють пікнотизований хроматин. Для ідентифікації апоптичних клітин часто застосовують флуоресцентне мікроскопічне дослідження з використанням флуорохромів, а також проточну цитофлуориметрію. Популярним, зокрема, є флуоресцентний метод аналізу апоптозу шляхом реєстрації зв'язування аннексину V. Здійснюють також імуногістохімічну детекцію білків-маркерів, що беруть участь у реалізації запрограмованої клітинної загибелі, виявляють ступінь олігонуклеосомної деградації ДНК. Для з'ясування ступеня окисних пошкоджень ДНК, викликаних дією активних форм кисню та азоту, визначають клітинні рівні маркерних молекул 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину і 3-нітротирозину [20].

Таким чином, мета роботи полягала у вивченні ступеня апоптичних змін у лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету через введення агматину – ендогенного продукту декарбоксилювання L-аргініну. Як відомо з ряду наукових робіт [21–23], а також підтверджено результатами власних досліджень [24, 25], агматин за експериментального цукрового діабету, з одного боку, має гіпоглікемічну дію та знижує ефект глюкозотоксичності у лейкоцитах крові, а з іншого – пригнічуючи надсинтез NO шляхом інгібування NO-синтази, знижує вміст проапоптичного фактора – цитотоксичного пероксинітриду. Такі ефекти агматину зумовлюють пригнічення оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах і, безумовно, мають вплив на генетично запрограмовану загибель цих клітин за умов діабету.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях масою 150–180 г. Тваринам забезпечували вільний дос-

туп до їжі та води і перебування у стандартних умовах віварію. Експерименти проводились згідно з національними «Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах», ухваленими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1985).

Тварини були поділені на чотири групи: I – контроль (К), II – контрольні тварини, яким вводили агматин (К + Агм), III – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД), IV – тварини з ЕЦД, яким вводили агматин (ЕЦД + Агм). Експериментальний цукровий діабет викликали внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину («Sigma», США), розчиненого в 10 мМ цитратному буфері (рН 5,5) з розрахунку 60 мг на 1 кг маси тіла. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали через 72 год після введення стрептозотоцину. Концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів «Філісіт-Діагностика» (Україна). В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози більше 14 мМ. Тваринам II та IV груп, починаючи з 3-го дня від моменту індукції діабету, внутрішньом'язово вводили агматин («Sigma», США), розчинений у фізіологічному розчині, в концентрації 20 мг/кг протягом 14 днів. Тваринам II та III груп протягом 14 днів внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин.

Шурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 15-й день 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 ($\rho = 1,076\text{--}1,078 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$) центрифугуванням при 630 г протягом 35 хв [26]. 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.

Протеїни лейкоцитів розділяли електрофоретично у блоках 10%-ного поліакриламідного гелю в присутності додецилсульфату натрію в буферній системі Лемлі [27]. Для визначення

молекулярної маси протеїнів використовували протеїнові стандарти фірми «Sigma», США.

В основу методу імуноблоту протеїнів покладено перенос білків з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля з наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Перенос здійснювали впродовж 2 год при силі струму 250 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт у буфері, що містив 25 мМ трис-НСІ (рН 8,3), 20 % метанол, 192 мМ гліцин, 0,1 % SDS. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 2 год 4 % розчином бичачого сироваткового альбуміну в TBS (50 мМ трис (рН 7,5), 150 мМ NaCl) з 0,05 % Твін-20. Далі мембрану інкубували з моноклональними антитілами до 3-нітротирозину (Monoclonal Anti-3-Nitrotyrosine antibody produced in mouse, clone 18G4, «Sigma-Aldrich», США), розведеними у 10 000 разів в TBS, впродовж 2 год з наступним промиванням TBS буфером (п'ять разів по 3 хв), після чого мембрану відмивали ЗФР/0,1% Твін-20 (п'ять разів по 3 хв), а тоді інкубували 1 год з антитілами до IgG миші, кон'югованими з пероксидазою хропу (Sheep anti-Mouse Ig Antibody, (H+L) HRP conjugate, «Millipore», США), розведеними 1:1000 у TBS буфері, після цього мембрану відмивали ЗФР/0,1 % Твін-20 (п'ять разів по 3 хв). Вирівнювання по протеїну в досліджуваних зразках проводили за інтенсивністю сигналу імунореактивних смуг, які виявлялися під час застосування моноклональних анти- β -актин антитіл («Sigma», США). Для хемілюмінесцентної імунодетекції білків на блотах використовували систему ECL (від англ. Luminol Enhancer Solution) («Amersham», ОК), до складу якої входив хемілюмінесцентний барвник люмінол. Усі компоненти ECL-суміші розчиняли у диметилсульфоксиді. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз результатів імуноблоту здійснювали за допомогою програми Gelpro32.

Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних протеїнів Bcl-2 та p53 використовували непрямий імунопероксидазний метод [28]. Лейкоцити, нанесені на предметне скло, фіксували у розчині метанолу за температури 4 °С протягом 20 хв та 3–4 с в охолодженому ацетоні. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,1 %

розчином тритону X-100 в ЗФР. Для блокування ендогенної клітинної пероксидази препарати інкубували в 0,3 % розчині H_2O_2 (5 хв). Блокування вільних центрів зв'язування здійснювали з допомогою інкубування в 1 % розчині БСА («Sigma-Aldrich», США), негативний контроль (Negative control reagent, «DAKO», США) використовували для блокування імуноглобуліноподібних молекул. Для детекції протеїнів p53 та Bcl-2 клітини інкубували з моноклональними антитілами до p53 («DAKO», США; клон DO-7, ізотип IgG_{2b}) та моноклональними антитілами до Bcl-2 («DAKO», США; клон 124, ізотип IgG₁) у ЗФР (1:25), що містив 1 % розчин БСА, впродовж 2 год при 4 °С. Зразки відмивали у ЗФР з 0,05 % тритоном X-100 та інкубували з другими біотинільованими антитілами «LSAB[®]2 Biotinylated Link for Streptavidin HRP/AP» («DAKO», США) у ЗФР (1:10), що містив 1 % розчин БСА, впродовж 1 год за кімнатної температури. Після відмивання зразки інкубували впродовж 30 хв із авідин-біотин-пероксидазним комплексом «ExtrAvidin Peroxidase» («Sigma-Aldrich», США) у розведенні 1:125. Кольорову реакцію для детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3-амінобензидину «Liquid DABSubstrateChromogen system» («DAKO», США).

Аналіз вмісту p53 та Bcl-2 у досліджуваних клітинах здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням $\times 40$ акропланового об'єктива мікроскопа MICROmed XS-5520 та відеокамери для мікроскопа (DCM310) з програмним забезпеченням (ScopePhoto). За інтенсивністю забарвлення досліджувані клітини були поділені на три групи: з негативною реакцією (p53⁻ та Bcl-2⁻), позитивною (p53⁺ та Bcl-2⁺) та різко позитивною (p53⁺⁺ та Bcl-2⁺⁺) реакцією. Негативними контролями специфічності зв'язування слугували клітини, які готували без додавання перших та других антитіл. На кожному препараті диференціювали 500 клітин.

Візуальну оцінку процесів апоптозу лейкоцитів за морфологічними ознаками здійснювали на мазках із суспензії лейкоцитів, зафарбованих за Романовським-Гімза, оцінювали кількість клітин з ознаками апоптозу та виражали ці зміни у відсотках. Виявляли токсикогенну зернистість в цитоплазмі, вакуолізацію цитоплазми і ядра, пікноз і каріорексис

ядра, цейозис мембрани. На кожному мазку підраховували 200 клітин, виявлених у різних полях зору мікроскопа. Апоптичний індекс визначали як відсоткове співвідношення кількості клітин з ознаками апоптозу до загальної кількості підрахованих клітин.

Біохімічну детекцію апоптозу лейкоцитів визначали за вмістом у клітині фрагментованої ДНК [2]. Лізис лейкоцитів проводили впродовж 30 хв на льодяній бані лізуючим буфером (5 мМ трис-НСІ, 20 мМ ЕДТА (рН 8,0), 0,5 % тритон X-100) у розрахунку 5 млн клітин на 0,05 мл буфера. Аліквоту кожної проби центрифугували 15 хв при 15 500 g, відділяючи інтактний хроматин (в осаді) від фрагментованої ДНК (у супернатанті). Кожну фракцію ресуспендували в 0,5 мл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0) і додавали по 0,6 мл 1 н НСІО₄, зразки охолоджували за температури 4 °С (20 хв). Одержані суспензії центрифугували 10 хв при 4000 g, супернатант відбирали. Гідроліз здійснювали у присутності 1 н НСІО₄ (0,6 мл) за температури 70 °С (20 хв). Проби охолоджували. В аліквотах супернатанту і осаду проводили кольорову реакцію з дифеніламіновим реагентом (1:2). Зразки поміщали у темне місце на 17 год. Проби фотометрували при довжині хвилі 570 нм проти контролю (дифеніламіновий реактив + +1 н НСІО₄). Ступінь пошкодження ДНК обчислювали у відсотках як співвідношення її кількості в супернатанті до сумарного вмісту в осаді та супернатанті.

Аналіз апоптозу за зв'язуванням аннексину здійснювали флуоресцентним методом V [29]. У роботі було використано набір реагентів Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, «BioVision» (США). Лейкоцити в кількості $2 \cdot 10^5$ ресуспендували у 0,5 мл зв'язуючого буфера: 10 мМ НЕРЕС/NaOH (рН 7,4), 140 мМ NaCl і 2,5 мМ CaCl₂. Додавали 5 мкл Annexin V-FITC (робоча концентрація 2,5 мкг/мл) та 5 мкл PI (робоча концентрація 0,5 мкг/мл). Клітини інкубували 15 хв у темряві за кімнатної температури. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі FACScan («Becton Dickinson», США), використовуючи детектор FL1 (для FITC) та FL2 (для PI). На кожний варіант досліду підраховували не менше 10 000 клітин. Результати виражали у відсотках від загальної кількості клі-

тин, застосовуючи наступну схему: Annexin V⁻/PI⁻ – живі клітини, Annexin V⁺/PI⁻ – клітини з ранніми ознаками апоптозу, Annexin V⁺/PI⁺ – клітини з пізніми ознаками апоптозу.

Статистичну обробку всіх результатів досліджень проводили з використанням програми Excel-2003 для Windows. Дані представляли у вигляді $M \pm m$. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних вираховували коефіцієнт Ст'юдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p \geq 0,95$, $p \geq 0,99$, $p \geq 0,999$.

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні у лейкоцитах тварин з ЕЦД вмісту протеїну – регулятора апоптозу p53 виявлено підвищення кількості клітин із позитивною реакцією (p53⁺) та різко позитивною реакцією (p53⁺⁺) порівняно з наявністю цього протеїну у контролі. Водночас виявлено зниження (на 27 %) кількості клітин із негативною реакцією на вміст протеїну p53 (p53⁻) порівняно з контролем (рис. 1, в та рис. 2).

На тлі збільшення вмісту в лейкоцитах тварин з ЕЦД протеїну p53 спостерігали зростання кількості антиапоптичного протеїну Bcl-2 (рис. 3, в). На фоні зниження числа клітин із негативною реакцією на цей протеїн (на 15 %) кількість клітин Bcl-2⁺ зростала на 79 % та Bcl-2⁺⁺ – на 49 % (рис. 4). Виявлені порушення кількісного співвідношення протеїнів-регуляторів апоптозу свідчать про посилення апоптичних процесів у лейкоцитах периферичної крові шурів за умов ЕЦД [21].

Введення агматину контрольним тваринам супроводжувалося зменшенням кількості клітин p53⁺⁺ і Bcl-2⁺⁺ та незначним підвищенням кількості клітин з негативною реакцією на ці протеїни (рис. 1, б, рис. 2, рис. 3, б, рис. 4).

У тварин з ЕЦД агматин призводив до достовірного зростання кількості клітин із негативною реакцією на p53, що супроводжувалося зменшенням кількості клітин з різко позитивною реакцією (p53⁺⁺) на 62 % (рис. 1, г, рис. 2). Водночас показано зростання кількості клітин Bcl-2⁻ (рис. 3, г, рис. 4). Таким чином, введення агматину за умов ЕЦД призводить до нормалізації вмісту в лейкоцитах протеїнів p53 і Bcl-2.

Одним із ранніх проявів апоптозу є зниження електрохімічного потенціалу мітохонд-

ріальних мембран, що супроводжується виходом з мітохондрій в цитоплазму цитохрому *c* та активацією каспази 3. Субстратами для цієї каспази є безліч протеїнів цитоскелету, ензими репарації ДНК, регулятори клітинного циклу, протеїнінази та ін. Деякі з перелічених протеїнів є внутрішньоклітинними інгібіторами ендонуклеаз, тому їхнє розщеплення під дією каспази 3 супроводжується активацією останніх. Під дією ендонуклеаз здійснюється фрагментація ядерної ДНК на низькомолекулярні фрагменти, що є однією з характерних біохімічних ознак апоптозу [7, 12]. Уже на цій стадії реєструються характерні для апоптозу зміни – конденсація хроматину і випинання ядерної мембрани. Вважають, що саме цей початковий етап фрагментації хроматину є ключовою подією апоптозу, після здійснення якого процес стає незворотним [7]. Іншими найхарактернішими для апоптичних клітин морфологічними змінами є утворення вип'ячувань (блебінг) плазматичної мембрани і зменшення розміру клітини, агрегація хроматину, фрагментація та пікноз ядра, вакуолізація і токсична зернистість цитоплазми, клазмоцитоз цитоплазми. Пізніми змінами під час апоптозу є фрагментація клітини з утворенням апоптичних тілець – везикул, які покриті плазматичною мембраною і можуть містити фрагменти ядер (рис. 5).

При дослідженні морфологічних ознак апоптозу методом світлової мікроскопії цитологічних препаратів (рис. 5) та вивченні ступеня олігонуклеосомної деградації ДНК (табл. 1) виявлено, що розвиток ЕЦД супроводжувався зростанням апоптичного індексу лейкоцитів (в 4,6 разу) та збільшенням вмісту у клітинах фрагментованої ДНК (в 3,8 разу) порівняно з контролем. У контрольних тварин агматин не викликав достовірних змін цих показників, тоді як за умов ЕЦД – сприяв зниженню апоптичного індексу лейкоцитів (на 74 % порівняно із ЕЦД) та значно пригнічував процес деградації ядерної ДНК (табл. 1). Отже, введення агматину тваринам з ЕЦД зумовлює пригнічення апоптичних процесів у лейкоцитах периферичної крові, на що вказує зниження як апоптичного індексу, так і вмісту фрагментованої ДНК до рівня величин у контрольній групі тварин.

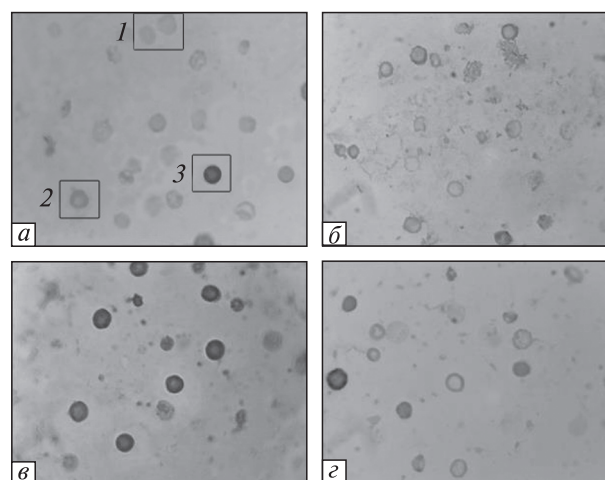


Рис. 1. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до протеїну p53 за умов введення агматину контрольним тваринам і щурам з експериментальним цукровим діабетом: *a* – контроль, *б* – контроль + агматин, *в* – експериментальний цукровий діабет, *г* – експериментальний цукровий діабет + агматин; 1 – негативна реакція (p53⁻); 2 – позитивна реакція (p53⁺); 3 – різко позитивна реакція (p53⁺⁺)

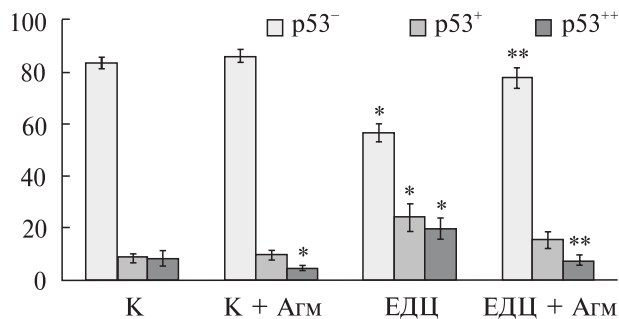


Рис. 2. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту у клітині протеїну p53 за умов введення агматину контрольним тваринам і щурам з експериментальним цукровим діабетом ($M \pm m$, $n = 4-5$): К – контроль, К + Агм – контроль + агматин, ЕЦД – експериментальний цукровий діабет, ЕЦД + Агм – експериментальний цукровий діабет + агматин. * Різниця достовірна порівняно з контролем, $P < 0,05$. ** Різниця достовірна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

Однією з ранніх ознак апоптозу в еукаріотичних клітинах є інверсія клітинної мембрани, що супроводжується появою фосфатидилсерину (ФС) на її зовнішній стороні. Кількість ФС можна виявити за зв'язуванням із поверх-

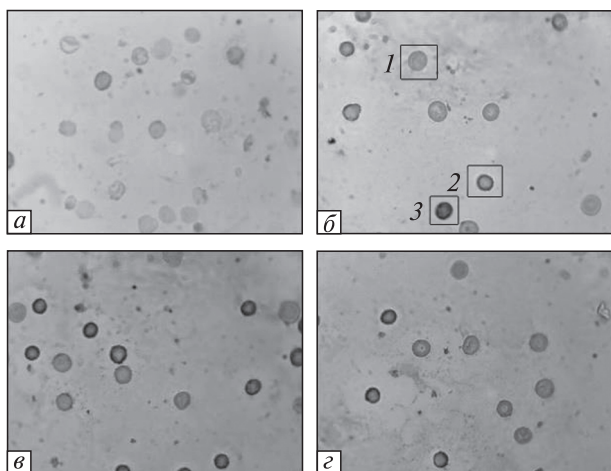


Рис. 3. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів з використанням антитіл до протеїну Bcl-2 за умов введення агматину контрольним тваринам та щурам з експериментальним цукровим діабетом: а – контроль, б – контроль + агматин, в – експериментальний цукровий діабет, г – експериментальний цукровий діабет + агматин; 1 – негативна реакція (Bcl-2⁻); 2 – позитивна реакція (Bcl-2⁺); 3 – різко позитивна реакція (Bcl-2⁺⁺)

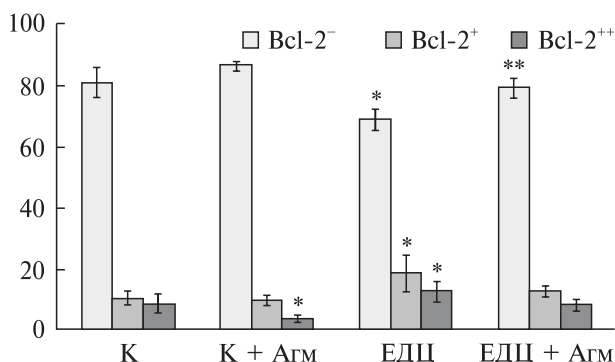


Рис. 4. Співвідношення кількості лейкоцитів залежно від вмісту в клітині протеїну Bcl-2 за умов введення агматину контрольним тваринам і щурам з експериментальним цукровим діабетом ($M \pm m$, $n = 4-5$): К – контроль, К + Агм – контроль + агматин, ЕЦД – експериментальний цукровий діабет, ЕЦД + Агм – експериментальний цукровий діабет + агматин. * Різниця достовірна порівняно з контролем, $P < 0,05$. ** Різниця достовірна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

нею клітини протеїну аннексину V [7]. Застосування подвійного флуоресцентного фарбування клітин аннексином V, міченим ФІТЦом та пропідій йодидом, дало змогу провести оцінку

ступеня вираженості апоптичних змін в лейкоцитах та отримати кількісний розподіл цих клітин крові на живі клітини, а також клітини на ранніх та пізніх стадіях апоптозу.

Дослідження клітин методом проточної цитофлуориметрії дало змогу виявити зростання кількості аннексин-позитивних клітин за діабету в 3,6 разу (табл. 2), що свідчить про збільшення кількості ФС на зовнішній стороні мембрани лейкоцитів. Водночас кількість аннексин-позитивних клітин, які також давали позитивну реакцію при фарбуванні пропідій йодидом, зростала майже в два рази (табл. 2). Це є ознакою порушення цілісності мембрани і свідчить про збільшення кількості мертвих клітин.

Введення агматину контрольним тваринам супроводжувалося зростанням кількості клітин із ранніми ознаками апоптозу на 31 %, а число клітин, які перебувають на пізніх стадіях апоптичної загибелі, не змінювалося (табл. 2). Водночас у тварин з ЕЦД агматин спричиняв зниження вмісту клітин із ранніми ознаками апоптозу на 31 % та клітин із пізніми ознаками апоптозу на 29 %.

З метою детекції апоптичних змін у лейкоцитах, викликаних дією активних форм кисню та азоту, на наступному етапі роботи визначали рівень у клітині маркера оксидативно-нітративного стресу – 3-нітротирозину, який утворюється в результаті нітрування залишків тирозину в молекулах протеїнів за участі таких форм азоту, як пероксинітрил і оксид азоту (IV). Концентрація 3-нітротирозину не залежить від надходження екзогенних метаболітів NO та ефектів плазмових тіолів, тому його вважають непрямим показником рівня продукції у клітині пероксинітрилу [30, 31]. Так, в умовах розвитку оксидативно-нітративного стресу надмірне утворення пероксинітрилу призводить до ушкодження всіх компонентів клітини. Цей агент здатен модифікувати азотисті основи та викликати одно- та двониткові розриви ланцюга молекули ДНК [32, 33]. Виникнення однострижкових розривів та, як результат, активація репараційного комплексу полі(АДФ-рибоза)-полімерази-1 виснажують внутрішньоклітинний пул НАД⁺. Ці події врешті-решт спрямовують клітину на шлях апоптозу [34, 35]. Нашими дослідженнями встановлено, що у

лейкоцитах тварин з ЕЦД значно підвищується вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів (рис. 6).

Введення тваринам агматину призводило до пригнічення процесу пероксинітрит-опосередкованої модифікації протеїнів у лейкоцитах як в контролі, так і у разі ЕЦД (рис. 6). Такий ефект агматину зумовлений його властивістю пригнічувати активність індукбельної ізоформи NO-синтази й надмірну продукцію оксиду азоту – прекурсора пероксинітриту, що підтверджено нашими попередніми дослідженнями [24]. Зниження вмісту нітротирозин-модифікованих протеїнів у разі діабету на фоні введення агматину свідчить про пригнічення оксидативно-нітративного стресу в лейкоцитах і є одним із механізмів, що опосередковує позитивний коригуючий вплив агматину на ці клітини крові за умов досліджуваної патології.

Отже, аналіз морфологічних, біохімічних і молекулярних маркерів апоптозу дав змогу встановити, що введення тваринам з ЕЦД агматину пригнічує генетично запрограмовану загибель лейкоцитів, інтенсивність якої значно підвищується за умов діабету. Очевидно, норма-

лізація інтенсивності протікання апоптичних процесів в лейкоцитах при введенні агматину тваринам з ЕЦД в деякій мірі зумовлена гіпоглікемічною дією цього поліаміну [25], що знімає ефект глюкозотоксичності в клітинах крові і зокрема в лейкоцитах.

Надлишкова генерація активних форм кисню й азоту на тлі виснаження резервів антиоксидантного захисту за умов діабету також впливає на функціональний стан клітини і може бути рушійним фактором у запуску апоптозу. До редокс-чутливих систем, що відповідають за внутрішньоклітинну регуляцію апоптозу, належать JNK і p38, які шляхом фосфорилування активують відповідальні за реалізацію летальної програми клітини білки-мішені: ядерний фактор κB (NF-κB) і p53 [8, 9]. Ряд досліджень [36–38] вказують на інгібуючий вплив агматину на процес активації і ядерної транслокації NF-κB, що може бути одним з механізмів регуляції апоптозу, індукованого в умовах оксидативно-нітративного стресу. Окрім того, що JNK може індукувати апоптоз шляхом фосфорилування і активації фактора транскрипції p53, ця протеїнкіназа здатна проника-

Таблиця 1. Величина апоптичного індексу (за морфологічними ознаками) та вміст фрагментованої ДНК в лейкоцитах крові щурів у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та на фоні введення агматину ($M \pm m$, $n = 4-5$)

Показники	Контроль	Контроль + агматин	ЕЦД	ЕЦД + агматин
Апоптичний індекс, %	0,53 ± 0,11	0,41 ± 0,10	2,43 ± 0,33 *	0,64 ± 0,13 **
Вміст фрагментованої ДНК, %	4,61 ± 0,35	3,79 ± 0,28	17,6 ± 0,81 *	4,54 ± 0,31 **

* Різниця достовірна порівняно з контролем, $P < 0,05$. ** Різниця достовірна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$.

Таблиця 2. Дослідження апоптозу лейкоцитів, %, за зв'язуванням аннексину V із поверхнею клітини та фарбуванням пропідій йодидом (PI) у нормі та за умов ЕЦД і на фоні введення тваринам агматину ($M \pm m$, $n = 4-5$)

Групи	Живі клітини (аннексин V ⁻ /PI ⁻)	Клітини з ранніми ознаками апоптозу (аннексин V ⁺ /PI ⁻)	Клітини з пізніми ознаками апоптозу (аннексин V ⁺ /PI ⁺)
Контроль	95,07 ± 0,93	1,80 ± 0,19	1,22 ± 0,13
Контроль + агматин	94,51 ± 0,91	2,35 ± 0,34 *	1,34 ± 0,15
ЕЦД	89,95 ± 0,63	6,49 ± 0,59 *	2,31 ± 0,03 *
ЕЦД + агматин	92,44 ± 0,69	4,50 ± 0,41**	1,63 ± 0,07 **

* Різниця достовірна порівняно з контролем, $P < 0,05$; ** Різниця достовірна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$.

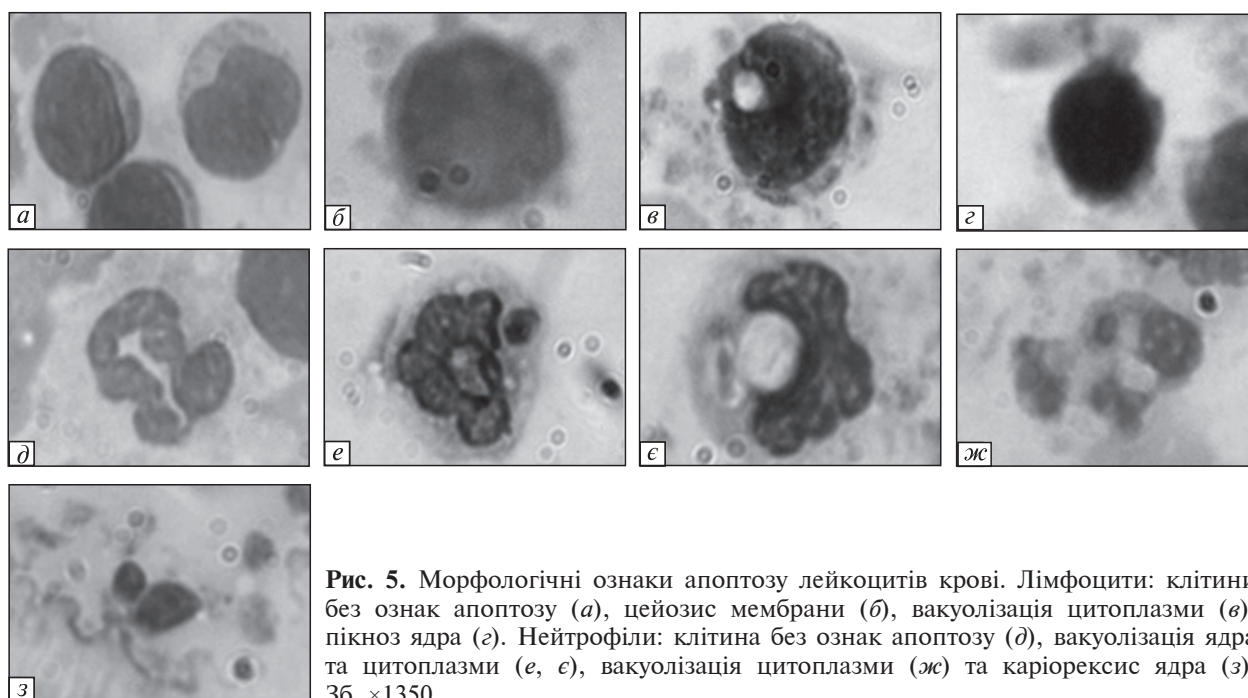


Рис. 5. Морфологічні ознаки апоптозу лейкоцитів крові. Лімфоцити: клітини без ознак апоптозу (а), цейозис мембрани (б), вакуолізація цитоплазми (в), пікноз ядра (д), вакуолізація ядра та цитоплазми (е, е), вакуолізація цитоплазми (ж) та кариорексис ядра (з). 36. ×1350

ти в мітохондрії, де фосфорилує та активує проапоптичні протеїни Bax і Bad, а також інактивує антиапоптичні протеїни родини Bcl-2. Як свідчать дані літератури [7, 39], агматин здатен пригнічувати фосфорилування JNK, яке є необхідною умовою її активації, що також може бути одним із механізмів регуляції процесу апоптозу за участі агматину.

З точки зору впливу агматину на лейкоцити контрольних тварин привертає увагу підвищення показника зв'язування з поверхнею клітин аннексину V, що свідчить про зростання кількості клітин із ранніми ознаками апоптозу в цій групі тварин. Інші показники, які були використані для дослідження апоптозу лейкоцитів, не зазнавали достовірних змін у контрольних тварин при введенні агматину. Різноманітні зміни досліджуваних показників у контрольних тварин та щурів з ЕЦД при введенні агматину можуть свідчити про те, що ефект цього поліаміну на лейкоцити залежить від функціонального стану імункомпетентних клітин крові. Варто також зазначити, що однією з численних функцій агматину в організмі є регуляція гомеостазу поліамінів, що задіяні у процесах реплікації ДНК, проліферації та підтриманні клітинного гомеостазу [40]. Про-

никаючи у клітини з позаклітинного простору шляхом активного перенесення системою транспорту путресцину, агматин індукує виснаження рівня поліамінів у клітині, пригнічуючи процеси клітинного росту. Пряма кореляція між зниженням внутрішньоклітинного рівня поліамінів і індукцією апоптозу у таких клітинах обумовила проведення ряду досліджень, присвячених з'ясуванню наявності в агматину проапоптичного потенціалу [22, 41, 42].

Як свідчать результати досліджень [22, 41–44], агматин проявляє різні ефекти залежно від типу і походження клітин. Агматин виявляє протекторний вплив стосовно зміни проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани (mitochondrial permeability transition, MPT) головного мозку і нирок [22, 41, 42], але проявляє дозозалежний різнонапрямлений ефект на мітохондрії печінки щура [44]. При низьких концентраціях (10–100 мкМ) агматин викликає зміну проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани шляхом індукції оксидативного стресу. Розвиток останнього є результатом підвищення генерації активних форм кисню, що утворюються як побічний продукт катаболізму агматину. Цей факт швидше за все пояснюється наявністю в мітохондріях печінки щурів

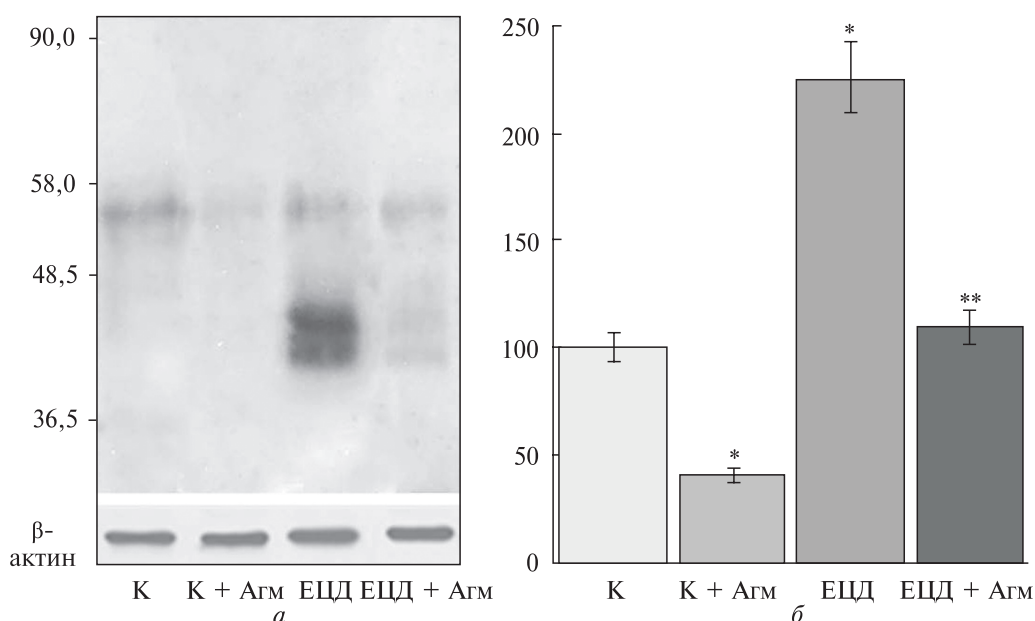


Рис. 6. Репрезентативний імуноблот-аналіз з використанням антитіл до 3-нітротирозину, кДа (а) і динаміка змін вмісту нітротирозин-модифікованих протеїнів, % (б) у лейкоцитах контрольної групи тварин (К), шурів з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД), а також на фоні введення тваринам агматину. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у контрольній групі прийнято за 100 % ($M \pm m$, $n = 4-5$). * Різниця вірогідна порівняно з контролем, $P < 0,05$. ** Різниця вірогідна порівняно з діабетом, $P < 0,05$

діаміноксидази, здатної окиснювати агматин з утворенням H_2O_2 і, ймовірно, OH^- [41–43]. При високих концентраціях ($\sim 0,5-1$ мМ) надлишок агматину, який не зазнав катаболізму, виступає скавенджером активних форм кисню, що утворилися за його участі, і запобігає індукції зміни проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани [44].

Висновки. Аналіз морфологічних, біохімічних і молекулярних маркерів апоптозу дав змогу встановити, що введення агматину тваринам з ЕЦД пригнічує генетично запрограмовану загибель лейкоцитів, інтенсивність якої значно підвищується за умов діабету. Агматин в умовах досліджуваної патології сприяє зменшенню числа клітин із ранніми і пізніми ознаками апоптозу та знижує значення апоптичного індексу, нормалізує вміст у клітинах протеїнів p53 і Bcl-2, пригнічує процес утворення фрагментованої ДНК. Введення агматину сприяє зниженню вмісту 3-нітротирозин-модифікованих протеїнів у лейкоцитах периферичної крові тварин з ЕЦД. Це підтверджує позитивний коригуючий вплив цього поліаміну і його участь

у процесах, що спричиняють пригнічення оксидативно-нітративного стресу в клітинах крові.

INHIBITING EFFECT OF AGMATINE ON GENETICALLY PROGRAMMED DEATH OF LEUKOCYTES IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

I.V. Ferents, I.V. Brodyak,
M.Ya. Lyuta, V.A. Burda, N.O. Sybirna

Ivan Franko National University, Lviv
E-mail: sybirna_natalia@yahoo.com
Borshchahivskiy Chemical
Pharmaceutical Plant, Kyiv

This study is an attempt to elucidate of agmatine effects upon leukocyte apoptosis in experimental diabetes mellitus (EDM). We demonstrated the increase in numbers of the leukocytes with both early and late signs of apoptosis at diabetes. Further changes in the morphofunctional state of the leukocytes include the increased amount of fragmented DNA, elevated apoptotic index and violated ratio of p53 to Bcl-2 proteins. Agmatine has been shown to exert direct corrective effects on leukocyte apoptosis: the content of p53 and Bcl-2 proteins was normalized, apoptotic index was decreased, the process of nuclear DNA degradation was ceased, while the amount of cells with early and late signs of apoptosis was diminished.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Куяк, Y.G., and Buchko, O., The impact of diabetes type 2 in apoptosis of immune cells in the blood of patients with unstable angina, *Ukraine drugs*, 2010, no. 3(12), pp. 51–53.
2. Orlova, E.A., and Komarevsev, V.N., Definition frahmentatsyy DNA in cells of renal tissue, *Actual problems of obstetrics and gynecology, clinical immunology and medical genetics*, 2001, no. 6, pp. 206–209.
3. Barycheva, L.Yu., Erdni-Goryaeva, N.E., and Golubeva, M.V., Expression of apoptosis markers in children with type 1 diabetes, *Med. Bull. North Caucasus*, 2013, vol. 8, no. 3, pp. 86–88.
4. Brownlee, M., The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes*, 2005, vol. 54, no. 6, pp. 1615–1625.
5. Kannan, Y., Tokunaga, M., Moriyama, M., Kinoshita, H., and Nakamura, Y., Beneficial effects of troglitazone on neutrophil dysfunction in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic mice, *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 137, no. 2, pp. 263–271.
6. Nabi, A.H., Islam, L.N., Rahman, M.M., and Biswas, K.B., Polymorphonuclear neutrophil dysfunctions streptozotocin-induced type 1 diabetic rats, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2005, vol. 38, no. 6, pp. 661–667.
7. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.*, 2007, vol. 35, no. 4, pp. 495–516.
8. Ryazanceva, N.V., Novickiy, V.V., Chasovskikh, N.Yu., Kaigorodova, E.V., Starikova, E.G., Starikov, U.V., Radzivil, T.T., and Krat, I.V., The role of redox-dependent signal systems in the regulation of apoptosis under oxidative stress condition, *Tsitologiya*, 2009, vol. 51, no. 4, pp. 329–333.
9. Chasovskikh, N.Yu., Role of protein kinases JNK and p38 in regulation of mononuclear leucocytes apoptosis in oxidative stress, *Bull. Siberian Med.*, 2008, no. 3, pp. 38–43.
10. Chumakov, P.M., Tumor protein p53 and its universal function in a multicellular organism, *Adv. Biol. Chem.*, 2007, vol. 47, pp. 3–52.
11. Chumakov, P.M., The function of the gene p53: the choice between life and death, *Biochemistry*, 2000, vol. 65, no. 1, pp. 34–47.
12. Fink, S.L., and Cookson, B.T., Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 4, pp. 1907–1916.
13. Liu, B., Chen, Y., and Clair, D.K.St., ROS and p53: versatile partnership, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, vol. 44, no. 8, pp. 1529–1535.
14. Sinha, K., Das, J., Pal, P.B., and Sil, P.C., Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis, *Arch. Toxicol.*, 2013, vol. 87, no. 7, pp. 1157–1180.
15. Bra, M., Kwinana, B., and Suzin, S.A., The mitochondria in programmed cell death : the death of the various mechanisms, *Biochemistry*, 2005, vol. 70, no. 2, pp. 284–293.
16. Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J.B., Smedt H.de., and Bultynck, G., A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1843, no. 10, pp. 2240–2252.
17. Greenberg, E.F., Lavik, A.R., and Distelhorst, C.W., Bcl-2 regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calcium signaling in normal and malignant lymphocytes: potential new target for cancer treatment, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1843, no. 10, pp. 2205–2210.
18. Sudakov, N.P., Nikiforov, S.B., Konstantinov, Y., and Lepheva, S.A., The role of mitochondria in the implementation of the mechanisms of programmed cell death, *Bull. East Siberian Sci. Center Academy of Medical Sciences*, 2007, no. 1(53), pp. 103–107.
19. Fruehauf, J.P., and Meyskens, F.L., Reactive oxygen species: a breath of life or death?, *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13, no. 3, pp. 789–794.
20. Siles, E., Martinez-Lara, E., Núñez, M.I., Muñoz-Gámez, J.A., Martín-Oliva, D., Valenzuela, M.T., Peinado, M.A., Ruiz de Almodóvar, J.M., and Javier Oliver, F., PARP-1-dependent 3-nitrotyrosine protein modification after DNA damage, *J. Cell Biochem.*, 2005, vol. 96, no. 4, pp. 709–715.
21. Grinevich, I., and Kamyshny, A., Influenze of the effect of experimental diabetes mellitus on the protein expression of apoptotic regulators Bcl-2 and p53 in the lymphoid follicles of the spleen, *Morphology*, 2010, vol. 4, no. 4, pp. 19–23.
22. Arndt, M.A., Battaglia, V., Parisi, E., Lortie, M.J., Isome, M., Baskerville, Ch., Pizzo, D.P., Ientile, R., Colombatto, S., Toninello, A., and Satriano, J., The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2009, vol. 296, no. 6, pp. C1411–C1419.
23. Haenisch, B., von Kügelgen, I., Bönisch, H., Göthert, M., Sauerbruch, T., Schepke, M., Marklein, G., Höfling, K., Schröder, D., and Molderings, G.J., Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2008, vol. 295, no. 5, pp. G1104–G1110.
24. Ferents, I.V., Lyuta, M.Ya., Brodyak, I.V., Burda, V.A., Fedorovych, A.M., and Sybirna, N.O., Effect of agmatine on the system of L-arginine/NO in peripheral blood leukocytes under the condition of experimental diabetes mellitus, *Med. Chem.*, 2011, vol. 13, no. 4, pp. 26–28.
25. Ferents, I.V., Brodyak, I.V., Lyuta, M.Ya., Burda, V.A., Gavrylyshyn, G.S., and Sybirna, N.O.,

- Effect of agmatine on the blood system parameters of rats under the condition of experimental diabetes mellitus, *Studia Biol.*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 65–72.
26. Lapovets, L.E., and Lutsyk, B.D., *Handbook of Laboratory Immunology*, Lviv, 2002.
 27. Laemmly, U., Beguin, F., and Gujer-Kellenberg, G., A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation, *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 47, no. 1, pp. 69–85.
 28. Berkalo, L.V., Bobovych, O.V., and Bobrova, N.A., *Methods of clinical and experimental research in medicine*, Poltava: Polimet, 2003, 320 p.
 29. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V, *J. Immunol. Meth.*, 1995, vol. 184, no. 1, pp. 39–51.
 30. Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A. and Ischiropoulos, H., Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2004, vol. 287, no. 2, pp. L262–L268.
 31. Souza, J.M., Peluffo, G., and Radi, R., Protein tyrosine nitration – unfunctional alteration or just a biomarker?, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, vol. 45, no. 4, pp. 357–366.
 32. Meretsky, V.M., and Korda, M.M., Relationship between oxidative stress and neutrophil apoptosis intensity in traumatic cranial injury associated with diabetes, *World Med. Biol.*, 2013, no. 4, pp. 75–79.
 33. Szaby, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R., Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2007, vol. 6, no. 8, pp. 662–680.
 34. Arya, A.K., Pokharia, D., Mishra, M., Kumar, H., and Tripathi, K., Impact of lymphocyte apoptosis in diabetes mellitus, *Asian J. Med. Sci.*, 2011, no. 2, pp. 1–6.
 35. Salvemini, D., Doyle, T.M., and Cuzzocrea, S., Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation, *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, vol. 34 (Pt 5), pp. 965–970.
 36. Hong, S., Kim, C.Y., Lee, J.E., and Seong, G.J., Agmatine protects cultured retinal ganglion cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis, *Life Sci.*, 2009, vol. 84, no. 1–2, pp. 28–32.
 37. Hong, S., Lee, J.E., Kim, C.Y., and Seong, G.J., Agmatine protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis in transformed rat retinal ganglion cell line, *BMC Neurosci.*, 2007, vol. 8, pp. 81.
 38. Hong, S., Park, K., Kim, C.Y., and Seong, G.J., Agmatine inhibits hypoxia-induced TNF-alpha release from cultured retinal ganglion cells, *Biocell*, 2008, vol. 32, no. 2, pp. 201–205.
 39. Condello, S., Currò, M., Ferlazzo, N., Caccamo, D., Satriano, J., and Ientile, R., Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-κB activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells, *J. Neurochem.*, 2011, vol. 116, no. 1, pp. 67–75.
 40. Pegg, A.E., Mammalian polyamine metabolism and function, *IUBMB Life*, 2009, vol. 61, no. 9, pp. 880–894.
 41. Battaglia, V., Grancara, S., Satriano, J., Saccoccio, S., Agostinelli, E., and Toninello, A., Agmatine prevents the Ca²⁺-dependent induction of permeability transition in rat brain mitochondria, *Amino Acids*, 2010, vol. 38, no. 2, pp. 431–437.
 42. Battaglia, V., Rossi, C.A., Colombatto, S., Grillo, M.A., and Toninello, A., Different behavior of agmatine in liver mitochondria: inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species?, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, vol. 1768, no. 5, pp. 1147–1153.
 43. Gardini, G., Cabella, C., Cravanzola, C., Vargiu, C., Belliardo, S., Testore, G., Solinas, S.P., Toninello, A., Grillo, M.A., and Colombatto, S., Agmatine induces apoptosis in rat hepatocyte cultures, *J. Hepatol.*, 2001, vol. 35, no. 4, pp. 482–489.
 44. Grancara, S., Battaglia, V., Martinis, P., Viceconte, N., Agostinelli, E., Toninello, A., and Deana, R., Mitochondrial oxidative stress induced by Ca²⁺ and monoamines: different behaviour of liver and brain mitochondria in undergoing permeability transition, *Amino Acids*, 2012, vol. 42, no. 2–3, pp. 751–759.

Надійшла 26.02.15