

СТРУКТУРНІ ТА КІЛЬКІСНІ ЗМІНИ ВУГЛЕВОДНИХ ДЕТЕРМІНАНТ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ ЕРИТРОЦИТАРНИХ МЕМБРАН ПРИ ВВЕДЕННІ АГМАТИНУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Встановлено, що розвиток експериментального цукрового діабету супроводжується посиленням процесу десіалювання олігосахаридних детермінант еритроцитарних глікопротеїнів, зменшенням кількості N- та O-зв'язаних гліканів у їхньому складі, а також зниженням величини негативного заряду поверхні еритроцитів. Введення агматину тваринам з експериментальним діабетом призводило до збільшення вмісту N- та O-гліканів у складі еритроцитарних глікопротеїнів, зростання кількості сіалових кислот та відновлення величини негативного заряду клітинної мембрани. Виявлені зміни конфігурації мембранних компонентів еритроцитів за умов діабету у разі дії агматину свідчать про циркулювання у кров'яному руслі клітин з репертуаром молекул адгезії та глікопротеїнових рецепторів, які є властивими для популяції молодих еритроцитів.

Ключові слова: сіалові кислоти, глікопротеїни, еритроцити, експериментальний цукровий діабет, лектини.

Вступ. Еритроцити є важливими компонентами крові, що задіяні у підтриманні гомеостазу на рівні цілого організму в нормі та за різних патологічних станів [1]. Ці клітини визначають мікрореологічні властивості крові та беруть участь у регуляції кислотно-основної рівноваги і водно-сольового обміну в організмі. Ключову роль у детермінації функціонального стану еритроцитів відіграє їхня плазматична мембрана. Цей клітинний елемент є визначальним у забезпеченні агрегаційних властивостей еритроцитів і їхньої деформабельності [2]. Зокрема, важливе значення у процесах адгезії та агрегації еритроцитів відіграє глікокалікс, який представлений вуглеводними компонентами мембранних глікопротеїнів і протеогліканів (що формують його зовнішню поверхню) та гліколіпідів, молекули яких знаходяться безпосередньо над фосфоліпідним бішаром [3]. Основна кількість карбогідратів глікокаліксу еритроцитів зосереджена у складі глікофоринів – гете-

рогенної групи глікопротеїнів, частка яких становить від 2 до 4 % усіх мембранних білків [4, 5]. Вуглеводна частина глікофоринів представлена в основному O-зв'язаними олігосахаридними послідовностями, але деякі з них містять у своїй структурі також один або два сайти N-глікозилування [5–7]. Завдяки високому ступеню сіалювання ці мембранні компоненти вносять найбільший вклад у формування негативного заряду і гідрофільних властивостей поверхні еритроцита. Забезпечуючи антиадгезивний ефект між однойменно зарядженими поверхнями клітин, сіалоглікокон'югати є визначальними у процесах взаємодії еритроцитів між собою, з ендотеліоцитами кровоносних судин та іншими циркулюючими клітинами крові [6]. Термінальні залишки сіалових кислот виступають сайтами упізнавання для великої кількості молекул – гормонів, лектинів, антитіл і неорганічних катіонів. Разом з тим вони виконують роль маскуючих агентів – захищають від розпізнавання олігосахаридні компоненти антигенних детермінант, рецепторів та інших макромолекул клітинної поверхні. За фізіологічних умов кількість сіалових кислот у складі поверхневих гліканів регулюється активністю мембранозв'язаних сіалідаз. Це родина ферментів, які здійснюють десіалювання надмембранних компонентів, визначаючи тим самим тривалість циркулювання еритроцитів у кров'яному руслі [8, 9]. Десіалювання мембранних структур супроводжується експонуванням субтермінальної галактози та секвестрації еритроцитів з кров'яного русла макрофагами селезінки і купферівськими клітинами печінки та макрофагами кісткового мозку [8]. Отже, зміна кількості та порушення структури сіалоглікопротеїнів, гангліозидів і протеогліканів впливає на структуру глікокаліксу, змінює величину фіксованого негативного заряду і гідрофільні властивості

еритроцитарної мембрани, що призводить до дисрегуляції фізіологічних процесів, появи патологічних форм еритроцитів і передчасного їхнього гемолізу у кров'яному руслі [9].

Для дослідження структурних змін в олігосахаридних ланцюгах глікокон'югатів застосовують лектини. Ці білки є незамінними диференційними молекулярними зондами, оскільки здатні вибірково зв'язуватися лише з комплементарними до них вуглеводними детермінантами глікокон'югатів [10]. Гліколіпіди знаходяться у нижніх шарах глікокаліксу в безпосередній близькості до фосфоліпідного бішару, тому існують топологічні перешкоди для їхньої взаємодії з лектинами. Зважаючи на це, зв'язування лектинів із поверхнею еритроцита відображає в основному участь у цій взаємодії глікопротеїнових карбогідратів [11, 12].

За умов діабету зміни в системі еритроциту, індуковані гіперглікемією, проявляються порушеннями у внутрішньоклітинному метаболізмі та структурно-функціональній організації мембранних компонентів. Усі ці перебудови можуть бути викликані як змінами на рівні кісткового мозку, так і у периферичному руслі під впливом продуктів ендогенної інтоксикації [1, 13]. Такі порушення функціонування еритроцитів є однією з патогенетичних ланок зміни реологічного статусу крові та розвитку судинних ускладнень при захворюванні на цукровий діабет.

Одним з підходів у лікуванні цукрового діабету є застосування речовин, які здатні впливати на метаболізм глюкози в умовах її підвищеної концентрації. Гіпоглікемічний ефект агматину – ендогенного продукту декарбоксілювання L-аргініну був встановлений багатьма дослідженнями [14–16]. Припускають, що цей поліамін проявляє інсулінотропну дію [14, 15] та стимулює засвоєння глюкози периферичними тканинами [16]. У наших попередніх дослідженнях на моделі стрептозотоцинового діабету у щурів встановлено, що введення агматину призводить до нормалізації рівня глюкози в крові [17]. Таким чином, цей поліамін потенційно здатний попереджувати розвиток метаболічних порушень, індукованих гіперглікемією.

Мета даної роботи – дослідити вплив агматину на структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікопротеїнів мембран

еритроцитів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету. Для досягнення поставленої мети визначали загальний вміст сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів; проводили диференціювання залишків сіалових кислот залежно від типу глікозидного зв'язку ($\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$), яким вони приєднані до субтермінальних моносахаридів, та досліджували інтенсивність процесів десіалювання (за рівнем експонування моносахаридів, які займають субтермінальну позицію відносно сіалових кислот). Крім цього, визначали зміну кількості N- та O-зв'язаних гліканів у складі еритроцитарних глікопротеїнів і аналізували зміну величини негативного заряду на поверхні еритроцитів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 150–180 г. Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води під час перебування у стандартних умовах віварію. Експерименти проводились згідно з «Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах», ухваленими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Тварини були поділені на чотири групи: 1) контроль; 2) контроль + агматин; 3) експериментальний цукровий діабет (ЕЦД); 4) експериментальний цукровий діабет + агматин. ЕЦД викликали внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину («Sigma», США), розчиненого в 10 мМ цитратному буфері (рН 5,5), із розрахунку 6 мг на 100 г маси тіла. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали через 72 год після введення стрептозотоцину. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози більше 14 мМ. Тваринам другої та четвертої груп, починаючи з 3-го дня від моменту індукції діабету, внутрішньом'язово вводили агматин («Sigma», США) у концентрації 20 мг/кг протягом 14 днів.

Забір крові для досліджень проводили з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100). Загальний вміст сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів визначали методом Ворена [18].

Агрегацію еритроцитів досліджували за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації «230 LA Биола» («НВФ Биола», РФ). Метод базується на аналізі флуктуацій світлопропускання суспензії, викликаних випадковою зміною числа частинок в оптичному каналі. Відносна дисперсія таких флуктуацій пропорційна середньому розміру агрегатів і використовується для дослідження кінетики агрегації. При калібруванні приладу середній розмір поодинокого еритроцита приймався за 1. Для оцінки агрегації в кювету приладу послідовно вносили 500 мкл суспензії відмитих еритроцитів, стандартизованих по оптичній густині, магнітну мішалку (швидкість обертання 200 об/хв) та 10 мкл індуктора агрегації – альціанового голубого (Alcian blue, 0,15%-ний розчин) або лектину (вихідна концентрація 1 мг/мл). Додавання індуктора супроводжувалося утворенням агрегатів клітин, розмір яких фіксувався приладом у реальному часі кожні 5 с. Ступінь агрегації визначали як максимальне значення розміру агрегатів, утворених після додавання у суспензію індуктора (у.о.), швидкість агрегації – як максимальний нахил кривої, яка відображає зміну середнього розміру агрегатів у часі (у.о. за 1 хв). Обраховували також показник агрегації, який показує відносне збільшення середнього радіуса агрегатів. Використовували програмне забезпечення AGGR V2.20.

Для дослідження індукованої лектином агрегації еритроцитів у роботі використовували лектини SNA («Лектинотест», Україна) і MAA («Sigma», США): SNA – лектин бузини чорної, який є специфічним до послідовностей NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DGalNAc, не зв'язує при цьому NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal послідовності в олігосахаридах; MAA – лектин акації амурської (афінний до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal, не зв'язує при цьому дисахаридних фрагментів, приєднаних (α 2 \rightarrow 6) глікозидним зв'язком) [11].

Десіалювання глікокон'югатів мембран еритроцитів здійснювали нейрамінідазою («Sigma», США) із *C. perfringens* (1U/50 мкл еритроцитарної маси). Суспензію клітин інкубували 1 год при 37 °C із наступною промивкою (4–5 разів) забуференим фізіологічним розчином (рН 7,4).

Лектинофенотипування еритроцитів здійснювали лектин-ферментним аналізом – ELLA

(від англ. enzyme-linked lectin assay) з використанням біотинільованих лектинів різної вуглеводзв'язувальної специфічності. В основі методу лежить здатність лектинів специфічно зв'язуватися з вуглеводними детермінантами глікокон'югатів плазматичних мембран еритроцитів, іммобілізованих на багатолунковому планшеті. Ступінь зв'язування виявляли у ферментативній реакції за участі лужної фосфатази, мічної авідином, яка каталізує перетворення р-нітрофенілфосфату в продукт жовтого кольору – р-нітрофенол. Інтенсивність забарвлення кольорового продукту має пряму залежність від кількості біотинільованих лектинів, які зв'язалися з глікопротеїнами мембрани еритроцитів. У дослідженні використовували високоадсорбційні плоскодонні 96-лункові планшети Nunc MaxiSorp. Для адгезії еритроцитів до дна лунок застосовували розчин полі-L-лізину (з молекулярною масою 15000–30000 Да), фіксацію клітин проводили глутаральдегідом (0,025%-ний розчин). У лунки почергово вносили розчини біотинільованих лектинів (3 мкг/мл), лужну фосфатазу та розчин субстрату. Інтенсивність забарвлення фіксували через 15 хв, вимірюючи оптичну густину розчину при 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Epoch (США).

Для лектин-ферментного аналізу еритроцитів було використано лектини RCA, PNA, SBA та PNA («Лектинотест», Україна): RCA – це лектин насіння рицини (афінний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридних послідовностей DGal(β 1 \rightarrow 3(4))DGlcNAc, які зазвичай зустрічаються у структурі N-гліканів); PNA – лектин насіння арахісу (специфічний до термінальних залишків галактози у складі дисахаридної послідовності DGal(β 1 \rightarrow 3)DGalNAc – так званого антигена Томсена-Фріденрайха, або T-антигена. T-антиген і T-антиген-споріднені структури на поверхні еритроцитів представлені у вигляді O-зв'язаних гліканів); SBA – лектин насіння сої (специфічний до термінальних залишків N-ацетил-D-галактозаміну); PNA – лектин насіння квасолі (афінний до складних олігосахаридних структур N-гліканів) [11].

Результати досліджень та їх обговорення. Сіалові кислоти – це чисельна різноманітна група моносахаридів, які за хімічною природою є похідними нейрамінової кислоти.

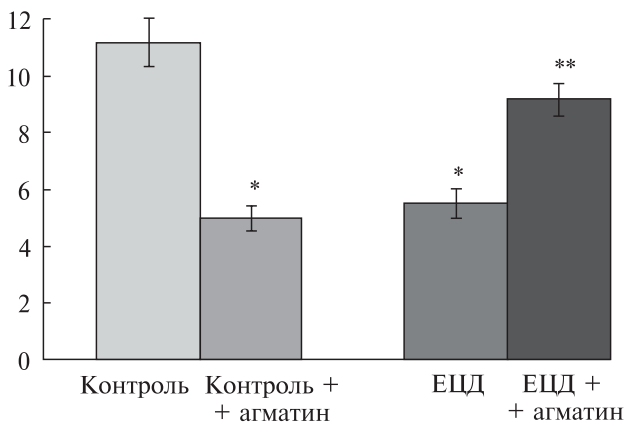


Рис. 1. Вплив агматину на вміст сіалових кислот (по вертикалі, мкг/мг білка) у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету. * Різниця достовірна порівняно з контролем, $P < 0,05$, ** Різниця достовірна порівняно з ЕЦД, $P < 0,05$

З-поміж близько 50 представників цього класу цукрів у ссавців найбільш поширеними є N-ацетилнейрамінова та N-гліколілнейрамінова кислоти. Близько 95 % похідних нейрамінової кислоти зосереджено у складі сіалоглікопротеїнів еритроцитарної мембрани і лише незначна частина припадає на гангліозиди [19].

У результаті проведених досліджень встановлено, що розвиток ЕЦД у щурів супроводжувався зменшенням вмісту сіалових кислот у складі олігосахаридних детермінант глікокон'югатів мембран еритроцитів на 51 % (рис. 1). Різностямованим виявився ефект введення агматину на рівень сіалових кислот у глікокаліксі еритроцитів. При введенні агматину контрольним тваринам цей показник знижувався на 55 %, а у разі ЕЦД — зростав на 67 % (рис. 1), досягаючи рівня у контрольних тварин.

Структурна різноманітність сіаловмісних глікопротеїнів зумовлена не тільки типом сіалових кислот у їхньому складі, але й залежить від типу зв'язку останніх із субтермінальними цукрами. Сіалювання олігосахаридних ланцюгів глікокон'югатів здійснюється за участі родини ферментів сіалілтрансфераз. Їхня специфічність визначається природою олігосахарид-акцептора, на який вони діють, і типом зв'язку, утворення якого каталізують [20, 21]. На основі

цього розрізняють сіалілтрансферази, які забезпечують утворення ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-глікозидного зв'язку між сіаловою кислотою і галактозою або ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-глікозидного зв'язку з галактозою чи N-ацетилгалактозаміном у структурі олігосахаридного ланцюга глікопротеїнів [21, 22]. Можливе також ($\alpha 2 \rightarrow 8$)-сіалювання, проте цей тип зв'язку зустрічається лише у деяких глікопротеїнах нервової тканини та сіаловмісних гліколіпідах — гангліозах [20]. Зважаючи на те, що зв'язок ($\alpha 2 \rightarrow 3$) набагато швидше піддається гідролітичному розщепленню за участі глікозидаз, ніж ($\alpha 2 \rightarrow 6$), тип зв'язку має важливе значення для підтримання кількості та структурної різноманітності сіаловмісних глікокон'югатів у складі плазматичної мембрани еритроцитів [22].

У нашій роботі для встановлення типу глікозидного зв'язку, яким сіалові кислоти приєднані до субтермінальних цукрів у структурі мембранних глікопротеїнів, проводили дослідження агрегаційної здатності еритроцитів. Як індуктори агрегації було використано лектини SNA та MAA. Аглотинація клітин лектинами зумовлена формуванням міжклітинних молекулярних містків. Ця здатність визначається наявністю на поверхні клітин великої кількості глікокон'югатів, з одного боку, та двох і більше центрів зв'язування відповідних вуглеводних детермінант у структурі лектинів, з іншого боку. Здатність кожної субдиниці лектину індивідуально зв'язувати цукри призводить до утворення поперечно-зв'язаної решітчастої структури агрегату [11]. Застосування лазерного аналізатора дало змогу в реальному часі слідкувати за процесом агрегату-утворення еритроцитів і здійснити кількісну оцінку динамічних та кінетичних параметрів цього процесу.

На рис. 2 зображено типові криві індукованої лектином агрегації еритроцитів. Слід відзначити особливий характер кривої агрегації в присутності SNA. У разі використання цього лектину крива агрегації мала стрибкоподібний характер і свідчила про відтермінований початок агрегації порівняно з поступовим збільшенням розміру агрегату у випадку застосування лектину MAA.

У табл. 1 наведено оцифровані результати SNA- та MAA-індукованої агрегації еритроцитів у нормі, за умов ЕЦД та після введення тваринам агматину. За умов ЕЦД знижується агре-

гаційна здатність еритроцитів, що виявлялося у зменшенні ступеня SNA-індукованої агрегації на 20 % та MAA-індукованої агрегації на 22 %. Показник агрегації при цьому знижувався на 40 та 44 % відповідно, а швидкість агрегатоутворення не зазнавала достовірних змін. У разі застосування лектину SNA спостерігали відтермінування початку агрегації еритроцитів.

На фоні зменшення вмісту сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів за умов ЕЦД (рис. 1) виявлені зміни показників SNA- та MAA-індукованої агрегації свідчать про зниження кількості як ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-, так і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язаних залишків цих цукрів. Виявлені порушення можуть бути зумовлені посиленням десіалювання мембранних структур чи втратою сіаловмісних гліканових епітопів еритроцитарної мембрани за умов ЕЦД, або ж поєднанням цих двох факторів.

У разі введення агматину контрольним тваринам ступінь SNA-індукованої агрегації знижувався на 28 %, показник агрегації – на 54 %. Швидкість агрегації не змінювалася, проте відтермінувався початок агрегатоутворення. В присутності лектину MAA показники агрегації, навпаки, підвищувалися: ступінь агрегації – на 25 %, показник агрегації – на 62 %, а швидкість агрегатоутворення зростала на 81 % порівняно з групою тварин, яким цей поліамін не вводили. Беручи до уваги дані про зниження вмісту сіалових кислот (рис. 1), зменшення місць зв'язування для лектину SNA у структурі глікопротеїнів мембран еритроцитів і посилення зв'язування лектину MAA (табл. 1), можна зробити висновок про заміну ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язаних сіалових кислот у термінальній позиції еритроцитарних гліканів на ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язані. Модифікація типу глікозидного зв'язку, можливо, спричинена порушеннями у процесі синтезу *de novo* олігосахаридних детермінант глікопротеїнів мембран еритроцитів у результаті зміни кількості або активності ензимів ($\alpha 2 \rightarrow 6$)- та ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-сіалілтрансфераз.

У тварин з ЕЦД агматин призводив до зростання показників агрегації у присутності SNA: розмір агрегату збільшувався на 37 %, показник агрегації – понад удвічі, швидкість агрегації – на 40 %. У разі використання лектину MAA спостерігали лише тенденцію до зростання цих показників. Враховуючи збіль-

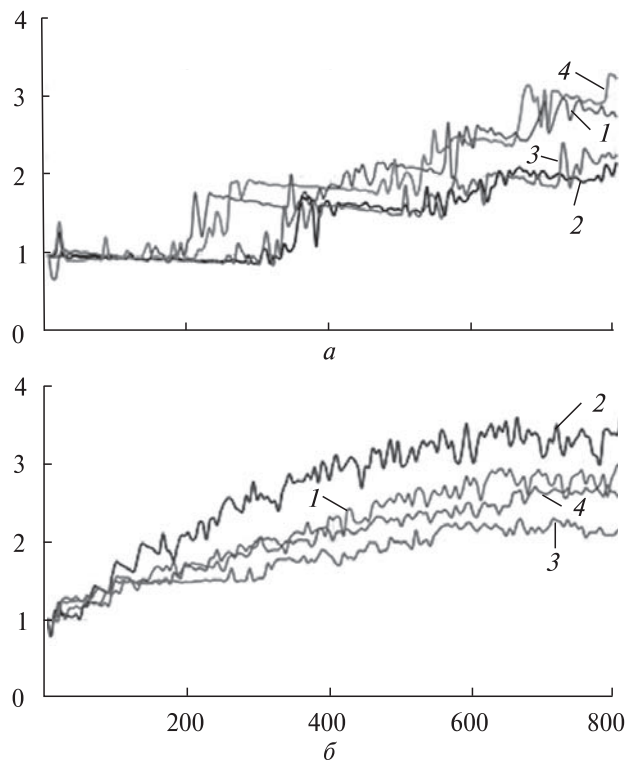


Рис. 2. Типові криві агрегації еритроцитів шурів (по вертикалі, у.о.) при використанні як індукторів агрегації лектину SNA (а) та лектину MAA (б); по горизонталі – час, с; 1 – контроль, 2 – контроль + агматин, 3 – ЕЦД, 4 – ЕЦД + агматин

шення вмісту сіалових кислот у складі глікокон'югатів мембран еритроцитів у тварин з ЕЦД на фоні введення агматину (рис. 1), можна вважати, що результати агрегації свідчать про збільшення кількості саме ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язаних сіалових кислот у структурі олігоцукрових детермінант глікопротеїнів.

Одним з підходів до вивчення процесів сіалювання–десіалювання мембранних структур є дослідження рівня експонування моноцукрів, які займають субтермінальну позицію щодо сіалових кислот і стають термінальними у разі відщеплення останніх зі складу олігоцукрового компоненту глікокон'югатів. У структурі сіалоглікопротеїнів такими є залишки D-галактози та N-ацетил-D-галактозаміну. З цією метою нами проведено фенотипування еритроцитів з використанням лектинів RCA, PNA та SBA.

У разі діабету, індукованого стрептозотцином, спостерігали зростання інтенсивнос-

ті зв'язування галактозоспецифічних лектинів із поверхневими глікокон'югатами еритроцитів: RCA – на 36 %, PNA – на 38 %. При використанні лектину SBA цей показник не зазнавав достовірних змін (табл. 2). Такі дані опосередковано вказують на посилене десіалювання як N-, так і O-зв'язаних олігосахаридних структур у складі мембранних глікопротеїнів. На користь цього припущення свідчить зменшення вмісту сіалових кислот у складі еритроцитарних глікокон'югатів за умов даної патології (рис. 1 і табл. 1).

Введення агматину контрольним тваринам спричиняло зниження інтенсивності зв'язування з еритроцитарними гліканами усіх трьох лектинів (табл. 2). Виявлені зміни можуть бути викликані маскуванням субтермінальних залишків галактози і N-ацетилгалактозаміну

у зв'язку зі збільшенням ступеня сіалювання відповідних мембранних структур або пригніченням процесу їхнього десіалювання. Врахування даних про зниження вмісту сіалових кислот в складі мембранних глікокон'югатів еритроцитів у контрольних тварин на фоні введення агматину (рис. 1) дає змогу зробити припущення, що такі зміни зумовлені ймовірно рядом інших факторів – відщепленням олігосахаридних фрагментів від еритроцитарних глікопротеїнів чи зниженням вмісту останніх на поверхні клітин [23].

При введенні агматину тваринам з ЕЦД ступінь зв'язування лектинів RCA та SBA із поверхневими глікокон'югатами еритроцитів зростає (табл. 2), при використанні PNA спостерігали лише тенденцію до збільшення цього показника. Таким чином, у термінальній по-

Таблиця 1. Показники індукованої лектином агрегації еритроцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину ($M \pm m$; $n = 6-8$)

Показники	Групи			
	Контроль	Контроль + агматин	ЕЦД	ЕЦД + агматин
Ступінь агрегації, у.о.				
SNA	2,98 ± 0,17	2,15 ± 0,15*	2,39 ± 0,15*	3,28 ± 0,20**
MAA	2,91 ± 0,22	3,63 ± 0,24*	2,27 ± 0,16*	2,69 ± 0,18
Показник агрегації, у.о.				
SNA	8,10 ± 0,96	3,76 ± 0,62*	4,85 ± 0,68*	10,02 ± 1,28**
MAA	7,78 ± 1,33	12,59 ± 1,70*	4,32 ± 0,77*	6,49 ± 0,97
Швидкість агрегації, у.о./хв				
SNA	0,49 ± 0,04	0,44 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,59 ± 0,05**
MAA	0,27 ± 0,03	0,49 ± 0,05*	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Час початку агрегації, с				
SNA	178,75 ± 7,60	271,25 ± 9,10*	238,75 ± 12,67*	197,50 ± 8,35**
MAA	22,50 ± 0,94	48,75 ± 4,70*	20,63 ± 0,63	43,13 ± 3,89**

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

Таблиця 2. Результати лектин-ферментного аналізу глікопротеїнів мембран еритроцитів щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину при використанні лектинів RCA, PNA та SBA, $E_{\lambda=405 \text{ нм}}$ ($M \pm m$; $n = 6-8$)

Лектин	Групи			
	Контроль	Контроль + агматин	ЕЦД	ЕЦД + агматин
RCA	0,239 ± 0,032	0,154 ± 0,006*	0,326 ± 0,005*	0,447 ± 0,043**
PNA	0,013 ± 0,002	0,006 ± 0,001*	0,018 ± 0,001*	0,022 ± 0,004
SBA	0,074 ± 0,006	0,029 ± 0,004*	0,061 ± 0,004	0,111 ± 0,005**

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

зиці олігосахаридних ланцюгів еритроцитарних глікопротеїнів поряд зі збільшенням рівня залишків сіалових кислот (рис. 1) підвищувався вміст залишків галактози і N-ацетилгалактозаміну. Отримані результати свідчать про зростання кількості як галактозилосмісних, так і сіалосмісних гліканових епітопів на поверхні еритроцитів крові щурів з ЕЦД на фоні введення агматину. Поряд з цим зростання показників SNA-індукованої агрегації (табл. 1) вказує на збільшення рівня тих сіалоглікокон'югатів, які в олігосахаридних ланцюгах містять термінально локалізовані NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DGalNAc дисахаридні фрагменти. Таким чином, виявлені зміни еритроцитарних гліканів при введенні агматину тваринам з ЕЦД свідчать про інтенсифікацію процесів глікозилювання *de novo* на стадії дозрівання еритроцитів у червоному кістковому мозку.

На наступному етапі роботи для детальнішого вивчення вуглеводного компоненту еритроцитарних глікопротеїнів було досліджено ступінь N- та O-глікозилювання в нормі, за умов ЕЦД та після введення тваринам агматину. Проводили фенотипування еритроцитів з використанням лектинів PHA та PNA. Як зазначалося вище, лектин PNA є високоселективним реагентом для виявлення T-антигена в структурі O-гліканів. У нормі ці глікоантигени на поверхні еритроцита екрановані сіаловою кислотою, що перешкоджає зв'язуванню лектину PNA із комплементарною йому дисахаридною послідовністю. Тому перед проведенням лектин-ферментного аналізу здійснювали відщеплення залишків сіалових кислот від еритроцитарних гліканів за допомогою оброблення клітин нейрамінідазою *C. perfringens*.

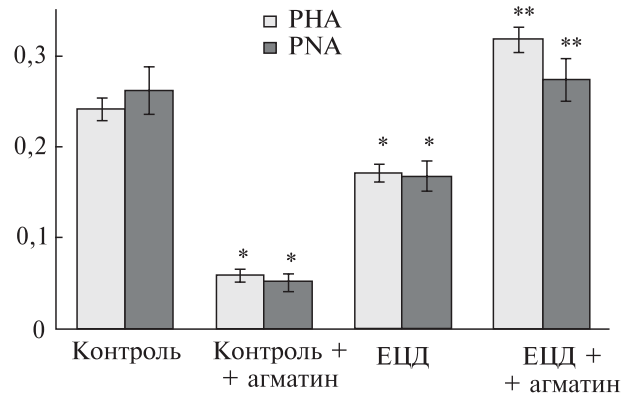


Рис. 3. Результати лектин-ферментного аналізу глікопротеїнів мембран еритроцитів щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину при використанні лектинів PHA та PNA ($M \pm m$; $n = 6-8$). По вертикалі – $E_{\lambda} = 405$ нм.

Як видно з рис. 3, за умов ЕЦД еритроцити характеризувалися зниженням ступеня зв'язування лектину PHA із поверхневими глікопротеїнами на 30 %, а лектину PNA – на 36 % порівняно з контролем. Отримані результати опосередковано свідчать про зменшення кількості N- та O-гліканів мембранних глікопротеїнів за умов діабету. Таким чином, можна зробити висновок, що зниження при діабеті вмісту сіалових кислот, приєднаних як ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-, так і ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-глікозидним зв'язком до субтермінальних моноцукрів у структурі еритроцитарних глікопротеїнів (рис. 1 і табл. 1), зумовлено не тільки посиленням процесів десіалювання за участі мембранозв'язаних сіалідаз (табл. 3), але й зниженням кількості сіалосмісних гліканових епітопів, що підтверджується і літературними даними [24].

Таблиця 3. Вплив агматину на індуковану альціаном агрегацію еритроцитів периферичної крові щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ($M \pm m$; $n = 6-7$)

Показник	Групи			
	Контроль	Контроль + агматин	ЕЦД	ЕЦД + агматин
Ступінь агрегації, у.о.	5,00 ± 0,29	7,88 ± 0,35*	7,27 ± 0,31*	4,24 ± 0,40**
Показник агрегації, у.о.	27,52 ± 2,84	61,80 ± 5,65*	52,60 ± 14,79*	17,96 ± 2,96**
Швидкість агрегації, у.о./хв	1,10 ± 0,04	1,92 ± 0,08*	1,54 ± 0,07*	0,99 ± 0,06**
Час початку агрегації, с	61,67 ± 7,38	56,67 ± 4,22	57,14 ± 4,48	92,50 ± 6,29**

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

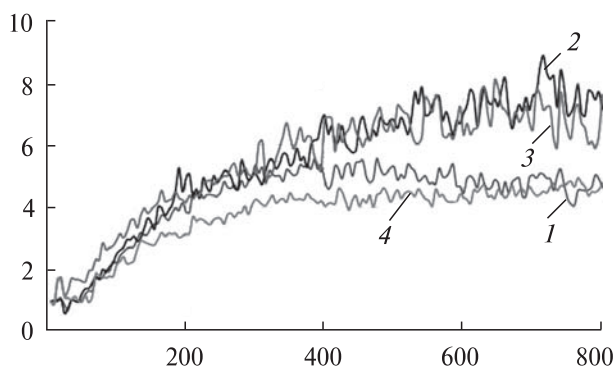


Рис. 4. Типові криві індукованої альціаном агрегації еритроцитів щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету на фоні введення агматину: по вертикалі – розмір агрегату, у.о.; по горизонталі – час, с; 1 – контроль, 2 – контроль + агматин, 3 – ЕЦД, 4 – ЕЦД + агматин

У разі введення контрольним тваринам агматину ступінь зв'язування лектину РНА з поверхнею еритроцитів знижувався на 76 %, лектину РНА – на 80 %. Це свідчить про зменшення кількості N- та O-гліканів на поверхні еритроцита, зокрема таких, які несуть у своєму складі ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язані сіалові кислоти (табл. 1). Отримані результати підтверджують запропоновану гіпотезу про те, що зниження вмісту сіалових кислот у цій досліджуваній групі тварин викликано зниженням кількості сіаловмісних олігосахаридних фрагментів у структурі глікопротеїнів мембран еритроцитів.

Введення агматину тваринам з ЕЦД призвело до протилежного ефекту – зростання кількості N- та O-гліканів у складі еритроцитарних глікопротеїнів, на що вказує збільшення інтенсивності зв'язування лектинів РНА (на 87 %) та РНА (на 64 %) із компонентами еритроцитарних мембран порівняно з еритроцитами тварин, яким цей поліамін не вводили. Отримані дані узгоджуються із попередньо отриманими результатами і свідчать про посилення процесів N- та O-глікозилювання.

Таким чином, введення агматину тваринам спричиняє кількісні та якісні зміни вуглеводних компонентів еритроцитарної мембрани, а характер цих змін визначається функціональним станом досліджуваних клітин. Можливо, це зумовлено здатністю агматину впливати на гомеостаз поліамінів, які є важливими медіа-

торами процесів росту та проліферації клітин у червоному кістковому мозку [25, 26].

Однією з головних функцій сіаловмісних глікон'югатів є формування фіксованого негативного заряду на поверхні еритроцита, що зумовлює електростатичне відштовхування між клітинами, забезпечуючи антиадгезивний ефект. Зміна вмісту сіалогліканів призводить до коливань цього показника та порушення гідрофільних властивостей мембран еритроцитів. Негативний заряд поверхні еритроцита на 60–90 % визначається саме наявністю сіалових кислот.

Для дослідження змін у величині негативного заряду мембран еритроцитів використовували органічний барвник альціановий голубий, який будучи специфічним гістологічним маркером кислих мукополісахаридів знайшов також широке застосування в клітинній біології як індуктор агрегації клітин. При додаванні до суспензії еритроцитів цей тетравалентний катіон вступає в електростатичні взаємодії з негативно зарядженими групами на поверхні клітини, знижуючи негативний заряд мембрани клітини. Це призводить до зменшення сил відштовхування між еритроцитами та виникнення агрегації за механізмом «виснаження» [27–29]. Порушення хімічного складу мембран еритроцитів і відповідні зміни величини фіксованого негативного заряду структур глікокаліксу на клітинній поверхні спричиняють зміни кількісних параметрів адсорбції альціанового голубого на межі поділу клітина – середовище та, відповідно, зміни ступеня агрегатоутворення цих клітин крові [27].

Таким чином, чим нижчим є негативний заряд клітинної поверхні, тим інтенсивніший процес агрегатоутворення. Крім того, швидкість агрегації, її вираженість будуть залежати від першопочаткового клітинного заряду, величина якого є одним з показників функціонального стану еритроцитів [30].

На рис. 4 представлено характерні криві індукованої альціаном агрегації еритроцитів у нормі та за умов ЕЦД, а також на фоні введення тваринам агматину. Встановлено, що у тварин з ЕЦД еритроцити характеризувалися збільшенням ступеня агрегації на 45 % та швидкості утворення агрегатів на 29 %. Показник агрегації зростав у понад два рази порівняно із еритроцитами контрольних щурів (табл. 3).

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити висновок, що виявлені зміни у структурі та кількості еритроцитарних гліканів за умов ЕЦД призводять до зменшення величини негативного заряду поверхні еритроцитів, а це зумовлює посилення їхніх адгезивно-агрегаційних властивостей. За нормальних фізіологічних умов формування агрегатів еритроцитів у вигляді монетних стовпчиків полегшує проходження цих клітин по мікросудинах та мінімізує витрати енергії. Проте при діабеті посилення оклюзії прекапілярів і капілярів еритроцитарними агрегатами спричиняє obturaцію судин у вузьких ділянках русла та загальне зниження швидкості периферичного кровотоку. В результаті тривалого склеювання червоних кров'яних тілець у них пригнічується транспортна функція кисню й утруднюється виведення діоксиду вуглецю, що спричиняє виражений негативний вплив на тканинний метаболізм. Окрім того, посилена агрегація еритроцитів супроводжується їхнім пошкодженням з наступним виділенням у кров еритроцитарних факторів зсідання крові, що сприяє виникненню гіперкоагуляції [31].

Введення тваринам агматину в контрольну групу та у разі ЕЦД мало різноспрямовану дію на показники індукованої альціаном агрегації еритроцитів. У здорових тварин цей поліамін викликав збільшення ступеня агрегації на 58 % і швидкості агрегації на 75 %, а показник агрегації зростав у 1,25 раза порівняно з контрольними тваринами, яким не вводили агматин. Таким чином, зміни в структурі глікопротеїнових компонентів еритроцитарної мембрани у відповідь на введення тваринам агматину призводять до зниження величини негативного заряду клітинної поверхні. Виявлені порушення сприяють посиленню агрегаційних властивостей еритроцитів, що впливає на параметри в'язкості крові і рівень мікросудинної перфузії [1].

У разі ЕЦД введення агматину призводило до відтермінування початку агрегатоутворення та зниження інших показників: ступеня агрегації – на 42 %, показника агрегації – на 66 % і швидкості агрегації – на 36 % порівняно із хворими тваринами, яким агматин не вводили (табл. 3). Підвищення значення величини негативного заряду клітинної мембрани є ха-

рактерною ознакою омолодження пулу еритроцитів у кров'яному руслі [19]. Виявлені зміни конфігурації мембранних компонентів еритроцитів тварин з експериментальним цукровим діабетом у разі дії агматину свідчать про циркулювання у кров'яному руслі клітин з репертуаром молекул адгезії та глікопротеїнових рецепторів, які є властивими для популяції молодих еритроцитів. Отже, у результаті проведених досліджень нами встановлено позитивний вплив агматину на функціональний стан червоних клітин крові за умов діабету.

Висновки. Розвиток експериментального цукрового діабету у щурів супроводжується зменшенням кількості N- та O-гліканів і посиленням процесів десіалювання олігосахаридних детермінант у складі глікопротеїнів мембран еритроцитів. Зниження вмісту термінальних залишків сіалових кислот і демаскування галактози призводить до зменшення величини негативного заряду поверхні еритроцитів і посилення їхніх адгезивно-агрегаційних властивостей. Введення агматину тваринам з експериментальним цукровим діабетом виявляє позитивний коригуючий вплив на структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікопротеїнів мембран еритроцитів та призводить до відновлення величини негативного заряду клітинної мембрани. Встановлено збільшення вмісту N- та O-зв'язаних гліканів та зростання кількості як галактозовмісних, так і сіаловмісних гліканових епітопів еритроцитів. Виявлені зміни конфігурації мембранних глікопротеїнів еритроцитів щурів з експериментальним цукровим діабетом у разі дії агматину свідчать про покращення функціонального стану червоних клітин крові та омолодження їхньої популяції.

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

Ivan Franko National University of Lviv
E-mail: iryna_ferenc@i.ua

STRUCTURAL AND QUANTITATIVE
CHANGES OF CARBOHYDRATE CHAIN
OF ERYTHROCYTE MEMBRANE
GLYCOPROTEINS IN EXPERIMENTAL
DIABETES MELLITUS AFTER TREATMENT
WITH AGMATINE

It was shown that development of experimental diabetes mellitus is accompanied by increase of desialylation of

carbohydrate determinants of erythrocyte membrane glycoproteins, removal of both O-linked and N-linked oligosaccharides from the glycoproteins and decrease of erythrocyte membrane negative charges. Treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with agmatine led to enhance the content of N- and O-glycans in the erythrocyte glycoproteins, increase in sialic acid content and restore the negative charge of the cell membrane. Detected changes in configuration of membrane components of red blood cells in diabetic animals after treatment with agmatine indicate circulating in the bloodstream cells with a repertoire of adhesion molecules and glycoprotein receptors which are inherent to the population of young erythrocyte.

І.В. Ференц, І.В. Бродяк,
М.Я. Люта, Н.А. Сибірна

СТРУКТУРНЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УГЛЕВОДНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН ПРИ ВВЕДЕНИИ АГМАТИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Показано, что развитие экспериментального сахарного диабета сопровождается усилением процесса десиалирования олигосахаридных детерминант эритроцитарных гликопротеинов, уменьшением количества N- и O-связанных гликанов в их составе, а также снижением величины отрицательного заряда поверхности эритроцитов. Введение животным с диабетом агматина приводило к увеличению содержания N- и O-гликанов в составе эритроцитарных гликопротеинов, возрастанию количества сиаловых кислот и восстановлению величины отрицательного заряда клеточной мембраны. Выявленные изменения конфигурации мембранных компонентов эритроцитов животных в условиях диабета при действии агматина свидетельствуют о циркуляции в кровяном русле клеток с репертуаром молекул адгезии и гликопротеиновых рецепторов, которые свойственны популяции молодых эритроцитов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы // Бюл. сиб. медицины. – 2006. – № 2. – С. 62–69.
2. Шилов А.М., Авшалумов А.С., Сеницина Е.Н. и др. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом // Рус. мед. журн. – 2008. – 16, № 4. – С. 35–39.
3. Iwatori M., Murata M., Toyoda M., Iwatori Y. Contribution of glycolipids to species-specific antigens on erythrocytes of several animal species as to recognition of antigens with rabbit anti-glycolipids and anti-erythrocyte antisera // Glycoconj. J. – 2009. – 26, № 4. – P. 467–476.

4. Remaley A.T., Ugorski M., Wu N. et al. Expression of human glycoporphin A in wild type and glycosylation-deficient Chinese hamster ovary cells. Role of N- and O-linked glycosylation in cell surface expression // J. Biol. Chem. – 1991. – 266, № 35. – P. 24176–24183.
5. Буслик Т., Сибірна Н. Агрегація еритроцитів, індукована речовинами різної природи, за умов цукрового діабету 1-го типу // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2007. – 45. – С. 181–186.
6. Chasis J.A., Mohandas N. Red blood cell glycoporphins // Blood. – 1992. – 80, № 8. – P. 1869–1879.
7. Fukuda M., Lauffenburger M., Sasaki H. et al. Structures of novel sialylated O-linked oligosaccharides isolated from human erythrocyte glycoporphins // J. Biol. Chem. – 1987. – 262, № 25. – P. 11952–11957.
8. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2009. – 19, № 5. – P. 507–514.
9. Murai M., Aramaki Y., Tsuchiya S. Alpha 2-macroglobulin stimulation of protein tyrosine phosphorylation in macrophages via the mannose receptor for Fc gamma receptor-mediated phagocytosis activation // Immunology. – 1996. – 89, № 3. – P. 436–441.
10. Sherwani A.F., Mohmood S., Khan F. et al. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas – An appraisal // Indian J. Clin. Bio-chem. – 2003. – 18, № 2. – P. 169–180.
11. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів, 2005. – 554 с.
12. Канюка О.П., Філяк Є.З., Сибірна Н.О. Особливості структурно-функціональної організації мембран еритроцитів мишей дикого типу та мишей із нокаутом гена pttg // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2011. – 5, № 1. – С. 97–104.
13. Курилович С.А., Кручинина М.В., Генералов В.М. и др. Электрические параметры и структура мембран эритроцитов при диффузных заболеваниях печени // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009. – 19, № 2. – С. 30–36.
14. Özyazgan S., Bıçakcı B., Özaydin A. et al. The effect of agmatine on the vascular reactivity in streptozotocindabetic rats // Pharm. Res. – 2003. – 48, № 2. – P. 133–138.
15. Raasch W., Schafer U., Chun J., Dominiak P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites // Brit. J. Pharm. – 2001. – 133, № 6. – P. 755–780.
16. Hwang S.L., Liu I.M., Tzeng T.F., Cheng J.T. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats // Diabetologia. – 2005. – 48, № 4. – P. 767–775.
17. Ференц І.В., Бродяк І.В., Люта М.Я. та ін. Вплив агматину на показники системи крові щурів за

- умов експериментального цукрового діабету // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2012. – 6, № 3. – С. 65–72.
18. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids // J. Biol. Chem. – 1959. – 234, № 8. – P. 1971–1975.
 19. Huang Y.X., Wu Z.J., Mehrishi J. et al. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties // J. Cell Mol. Med. – 2011. – 15, № 12. – P. 2634–2642.
 20. Ulloa F., Real F.X. Differential distribution of sialic acid in alpha2,3 and alpha2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues // J. Histochem. Cytochem. – 2001. – 49, № 4. – P. 501–510.
 21. Toegel S., Pabst M., Wu S.Q. et al. Phenotype-related differential alpha-2,6- or alpha-2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes // Osteoarthritis Cartilage. – 2010. – 18, № 2. – P. 240–248.
 22. Chapman S.A., Bonshek R.E., Stoddart R.W. et al. Localisation of alpha(2,3) and alpha(2,6) linked terminal sialic acid groups in human trabecular meshwork // Brit. J. Ophthalmol. – 1994. – 78, № 8. – P. 632–637.
 23. Gumus A., Balcan E. Determination of glycoconjugate residues of erythrocytes at different age groups of rats // Int. J. Hematol. and Oncol. – 2010. – 20, № 1. – P. 6–13
 24. Выдыборец С.В. Изменения эритроцитов при сахарном диабете (обзор) // Врачеб. дело. – 1990. – № 2. – С. 56–61.
 25. Pegg A.E. Mammalian polyamine metabolism and function // IUBMB Life. – 2009. – 61, № 9. – P. 880–894.
 26. Satriano J., Matsufuji S., Murakami Y. et al. Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels // J. Biol. Chem. – 1998. – 273, № 25. – P. 15313–15316.
 27. Булегенов К.Е., Балмуханов В.С. Агрегация эритроцитов в присутствии альцианового голубого // Кардиология. – 1993. – 33, № 4. – С. 42–44.
 28. Baskurt O.K., Farley R.A., Meiselman H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study // Amer. J. Physiol. – 1997. – 273, № 6. – P. H2604–H2612.
 29. Rampling M.W., Meiselman H.J., Neu B., Baskurt O.K. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation // Biorheology. – 2004. – 41, № 2. – P. 91–112.
 30. Люсов В.А., Белоусов Ю.Б., Савенков М.П. К методу определения агрегации тромбоцитов и эритроцитов // Лаб. дело. – 1976. – № 8. – С. 463–468.
 31. Ашкинази И.Я. Агрегация эритроцитов и тромбопластинообразование // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1972. – 74, № 7. – С. 28–31.

Надійшла 31.01.13