

## ВПЛИВ ФОТОБІОМОДУЛЯЦІЙНОЇ ТЕРАПІЇ НА РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВІ ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

О.І. КАРМАШ<sup>1\*</sup>, М.Я. ЛЮТА<sup>1</sup>, А.М. КОРОБОВ<sup>2</sup>, Н.О. СИБІРНА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра біохімії, Львівський національний університет ім. Івана Франка, Львів, Україна

<sup>2</sup> Лабораторія квантової біології та квантової медицини, Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, Харків, Україна

E-mail: sashakarmash@gmail.com

*Оксидативний стрес — одна з головних причин розвитку важких ускладнень при цукровому діабеті (ЦД). Сучасні фармакологічні препарати, хоча і здатні знижувати рівень глюкози в крові, рідко проявляють антиоксидантні властивості. Існують дані про широкий спектр біологічної активності фотобіомодуляційної терапії (ФБМТ). Потенційна цукрознижувальна та антиоксидантна дії роблять цей тип терапії перспективним у застосуванні для лікування ЦД та його ускладнень. Проведено дослідження впливу ФБМТ на стан системи антиоксидантного захисту лейкоцитів крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД. Встановлено, що у щурів з ЦД за опромінення відбувається підвищення активності супероксиддисмутази та нормалізація вмісту маркерів оксидативного стресу (ТБК-позитивних продуктів, окисно модифікованих білків та кінцевих продуктів глікації білків).*

**Ключові слова:** цукровий діабет; фотобіомодуляційна терапія; лейкоцити крові; оксидативний стрес; система антиоксидантного захисту.

**Вступ.** Цукровий діабет — надзвичайно важке хронічне захворювання, яке є, одночасно, одним із найбільш поширених хронічних патологічних станів. Він характеризується неконтрольованою гіперглікемією, яка виникає через нестачу інсуліну або інсулінорезистентність периферичних тканин організму. Хронічне підвищення концентрації глюкози у крові за ЦД викликає цілу низку важких ускладнень, зокрема, нефропатії, кардіоміопатії, ретинопатії тощо. Основною ж причиною виникнення діабетичних ускладнень є супутній розвиток оксидативного стресу через надпродукцію активних форм Оксигену (АФО), які здатні пошкоджувати клітини, особливо їхні мембранні структури [1].

Фотобіомодуляційна терапія (ФБМТ, photobiomodulation therapy, PBM) відома вже близь-

ко 50 років, проте досі не отримала широкого поширення через недостатню з'ясованість молекулярних та клітинних механізмів дії. Наразі ФБМТ практикується як частина фізіотерапевтичних методів лікування багатьох захворювань та поширена практично у всьому світі. У ФБМТ застосовують різні джерела світла (лазери, світлодіоди) та різні спектри у видимому та інфрачервоному діапазонах. Окрім того, є багато досліджень, котрі підтверджують біологічну активність ФБМТ. Встановлено, що ФБМТ позитивно впливає на проліферацію клітин (фіброblastів, кератиноцитів) та процес загоєння ран, [2] і викликає активацію продукування АТФ мітохондріями [3].

Ключове питання застосування ФБМТ полягає не в тому, чи світло має біологічні ефекти, а як енергія від лазера або світлодіода працює на рівні клітини та організму, і якими є оптимальні параметри світла для його використання з лікувальною метою.

Сучасні методи лікування ЦД передбачають інсулінотерапію, прийом цукрознижувальних препаратів, діету та фізичне навантаження. Фармакологічні препарати, в свою чергу, володіють різними механізмами зниження концентрації глюкози в крові, однак лише деякі з них виявляють антиоксидантні властивості. У попередніх дослідженнях нами було продемонстровано [4], що ФБМТ, знижує концентрацію глюкози та вміст глікозильованого гемоглобіну у крові щурів з експериментальним ЦД. Крім того є дані, що за використання ФБМТ знижується вміст малонового діальдегіду у опроміненіх тканинах при гострих хірургічних ранах у щурів з ЦД [5], що може свідчити про вплив ФБМТ на систему антиоксидантного захисту клітин.

Метою нашої роботи було дослідити ефект фотобіомодуляційної терапії на стан системи

антиоксидантного захисту у лейкоцитах крові щурів за умов діабетіндукованого оксидативного стресу.

**Матеріали та методи.** *Індукція діабету.* Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Wistar масою 120–180 г, які утримувалися в стандартних умовах віварію із вільним доступом до їжі та води. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з положенням про «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах», ухваленим Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Експериментальний ЦД (ЕЦД) індукували внутрішньоочеревинним введенням стрептозоцину («Sigma», США), розведеного у 10 мМ Na-цитратному буфері (рН 4,5) у розрахунку 60 мг стрептозоцину на 1 кг маси тварин. Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл цитратного буферу. Розвиток діабету контролювали за концентрацією глюкози у крові через 72 години після ін'єкції. У експериментах використовували щурів із концентрацією глюкози у крові більше ніж 12 ммоль/л.

*Дизайн експерименту.* Тварини були поділені на 4 групи: 1 – контрольні тварини; 2 – контрольні тварини, яких опромінювали; 3 – тварини з ЕЦД; 4 – тварини з ЕЦД, яких опромінювали. Щурів опромінювали протягом 5 хв щодня упродовж 10 днів. Як джерело світла використовували матрицю із 30 надяскравих світлодіодів із загальною потужністю 150 мВт з довжиною хвилі 630–660 нм, яка є аналогом фотонних матриць «Барва-Флекс/ФМ» («Лазер та Здоров'я», Україна).

*Збір крові.* Після 10 днів опромінення здійснювали збір крові шляхом декапітації тварин під ефірним наркозом. Для запобігання згортання, кров збирали у пробірки з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1 : 100). Порцію крові (2 мл) центрифугували 15 хв при 3000 об/хв для отримання плазми, яку зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальших досліджень. Решту крові використовували для виділення лейкоцитів.

*Виділення лейкоцитів.* Лейкоцити виділяли методом центрифугування крові у градієнті фі-

колу-тріомбразу ( $\rho = 1,076-1,078$ ). Виділені клітини двічі промивали фосфатним буфером (PBS: (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,8 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,4) і використовували в експериментах або миттєво заморожували рідким азотом і зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для досліджень використовували лізати лейкоцитів. Клітини ( $2 \times 10^6$ ) лізували за допомогою 25 мМ Tris-HCl буферу (рН 7,5), що містив 0,5 % Triton X-100, 100 мМ KCl, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ EDTA та інгібітори протеаз («Sigma», США). Лізати центрифугували протягом 15 хв при 8000 об/хв, отриманий супернатант використовували у експерименті.

*Визначення активності каталази і СОД.* Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за допомогою методу, що базується на здатності  $\text{H}_2\text{O}_2$  утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс.

У дослідну і холосту проби вносили 0,5 мл 0,05 М Tris-HCl буферу (рН = 7,8) і 1 мл 0,03%-вого розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Реакцію у дослідній пробі запускали додаванням 0,05 мл лізату лейкоцитів. Зразки інкубували 10 хв при  $37^{\circ}\text{C}$ , після чого реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 4%-вого розчину амоній молібдату у 0,25 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Після зупинки реакції у холосту пробу додавали 0,05 мл лізату. Оптичну густину вимірювали при  $\lambda = 410$  нм, результат виражали у мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 1 мг білка за 1 хв [6].

Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) визначали методом, в основі якого лежить здатність СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніонрадикали, які утворюються у результаті аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату. В результаті цієї реакції нітросиній тетразолій відновлюється з утворенням гідрозинтетразолію (нітроформазану). Активність ферменту визначали за відсотком блокування утворення нітроформазану, оскільки за присутності СОД активність відновлення нітросинього тетразолію знижується. Супероксиддисмутазну активність виражали в умовних одиницях (1 у.о. = 50 % блокування реакції утворення нітроформазану) на 1 мг білка.

Активність СОД визначали в лізатах лейкоцитів. До 0,75 мл інкубаційної суміші (39 мМ EDTA-Na, 114 мМ нітротетразолій синій (метаформа), 54 мМ феназинметасульфат, розчинені

у 0,15 М Na-K-фосфатному буфері (рН 7,8) додавали 0,05 мл лізату лейкоцитів та 0,025 мл 2 мМ розчину НАДН (дослідна проба). У холоду пробу замість лізату вносили 0,05 мл dH<sub>2</sub>O. Зразки інкубували 10 хв при 37 °С і проводили вимірювання екстинкції при  $\lambda = 540$  нм [7].

**Вимірювання концентрації білка.** Концентрацію білка у досліджуваних зразках вимірювали за методикою Лоурі з використанням бичачого сироваткового альбуміну (БСА) як стандарту [8].

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

У пробірки вносили 0,8 мл 0,85 % NaCl, 0,2 мл лізату лейкоцитів, 1 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2н HCl і 1 мл 10 % ТХО. У контрольну пробу замість 2,4-ДНФГ вносили 1 мл 2н HCl. Проби інкубували 1 год при 37 °С, центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Осад промивали тричі 5 % ТХО, додавали 5 мл 8 М розчину сечовини, інкубували 5 хв у киплячій водяній бані до повного розчинення. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували при  $\lambda = 370$  (альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру – ОМБ<sub>370</sub>) та  $\lambda = 430$  нм (похідні основного характеру – ОМБ<sub>430</sub>) [9]. Вміст ОМБ<sub>370</sub> виражали як мкмоль карбонільних груп білків на 1 мг білка, використовуючи молярний коефіцієнт абсорбції  $22\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ , а вміст ОМБ<sub>430</sub> виражали в у.о. карбонільних груп білків на 1 мг білка.

**Визначення вмісту кінцевих продуктів оксидативної білків.** Вміст кінцевих продуктів оксидативної білків (Advanced Oxidation Protein Products, AOPPs) визначали згідно методики Witko-Sarsat [10] у модифікації Kalousova [11]. У 96-луночковому мікропланшеті у холоду пробу вносили 0,2 мл PBS, а в дослідні проби – 0,05 мл лізату лейкоцитів або плазми крові і 0,15 мл PBS. У всі проби додавали 0,01 мл 1,16 М калій йодиду (KI) і 0,02 мл концентрованої оцтової кислоти. Оптичну густину визначали при  $\lambda = 340$  нм. Вміст кінцевих продуктів оксидативної білків виражали у мкмоль хлораміну на 1 г білка.

**Визначення вмісту продуктів глікації білків.** Вміст продуктів глікації білків (Advanced Glycation End products, AGEs) визначали згідно методики, описаної у [12]. Лізати лейкоцитів розводили у 20 разів у 0,1 н NaOH, а плазму крові – у 50 разів у PBS. Як стандарт використовували розчин BSA (1 мг/мл у 0,1 н NaOH), який приймався за 1 одиницю флуоресценції (AU). Вміст AGEs у досліджуваних зразках визначали шляхом вимірювання флуоресценції збудження при  $\lambda = 370$  нм та емісії при  $\lambda = 440$  нм. Вміст AGEs виражали у AU на 1 мг білка.

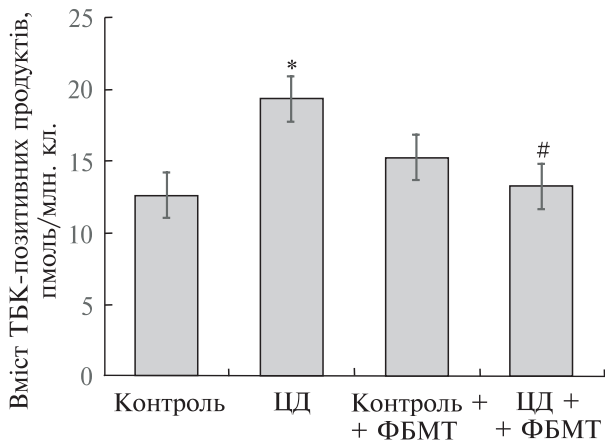
**Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів.** Вміст ТБК-позитивних продуктів визначали методом, що базується на здатності цих сполук утворювати забарвлений триметинний комплекс із тіобарбітуровою кислотою (ТБК), який реєструється спектрофотометрично при  $\lambda = 532$  нм. Результат виражали у пмоль/млн. клітин з використанням молярного коефіцієнту екстинкції  $152\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  [13].

**Статистичний аналіз.** Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Дані представлені у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартне відхилення. Достовірність різниці між групами вираховували за допомогою критерію Стьюдента (р). Значення  $P < 0,05$  вважалося статистично достовірним.

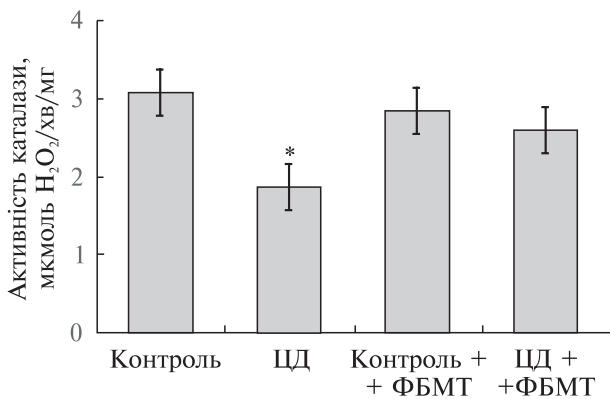
**Результати.** Важливим показником темпів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зокрема, та розвитку оксидативного стресу загалом є вміст ТБК-позитивних продуктів.

Встановлено, що за умов ЦД вміст ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах крові щурів зростає у 1,5 раза порівняно з контролем. За ЦД та щоденного впливу ФБМТ відбувається зниження цього показника у 1,4 раза порівняно зі значенням у неопромінених тварин (рис. 1).

Для з'ясування причин такого ефекту ФБМТ ми вирішили дослідити її вплив на стан антиоксидантної системи лейкоцитів здорових щурів та за умов стрептозотоцин-індукованого ЦД. У результаті проведених досліджень виявлено, що у лізатах лейкоцитів щурів з ЦД відбувається зниження активності каталази та СОД у 1,5 раза та 1,7 раза, відповідно, порівняно з контролем. За умов опромінення тварин з ЦД не виявлено підвищення активності каталази, натомість активність СОД підвищується у 1,3 раза по-



**Рис. 1.** Вміст ТБК-позитивних продуктів у лізатах лейкоцитів, пмоль/млн. кл. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $P < 0,05$ ; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД,  $P < 0,05$



**Рис. 2.** Активність каталази у лізатах лейкоцитів, мкмоль  $H_2O_2$ /хв/мг. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $P < 0,05$ ; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД,  $P < 0,05$

рівняно із таким же показником у неопромієних діабетичних тварин (рис. 2, 3).

На наступному етапі досліджень проаналізовано вплив ФБМТ на вміст окисно модифікованих білків (ОМБ) у лізатах лейкоцитів крові здорових щурів та щурів з ЦД. Ми виявили, що за умов ЦД вміст ОМБ як нейтрального, так і основного характеру зростає у 2,4 раза та 2,0 рази, відповідно, порівняно з контролем. Опромінення тварин із ЦД сприяє зниженню вмісту ОМБ (у 2,3 раза для ОМБ<sub>370</sub> та 2,1 раза для ОМБ<sub>430</sub>) у лейкоцитах крові порівняно із цими ж показниками у неопромієних діабетичних тварин. Слід зазначити, що опромінення здо-

рових щурів спричиняє різке підвищення ОМБ<sub>370</sub> (у 2,9 раза) та ОМБ<sub>430</sub> (у 2,4 раза) у порівнянні зі значеннями у неопромієних тварин (рис. 4).

Наступним завданням нашої роботи було дослідити вміст АОРР та АГЕ.

В результаті наших досліджень встановлено, що у лізатах лейкоцитів крові щурів за умов ЦД вміст АОРР знижується у 1,4 раза, а вміст АГЕ – у 1,8 раза порівняно з контролем. У разі впливу ФБМТ у тварин з ЦД (рис. 5, а) спостерігається тенденція до нормалізації вмісту цих показників (рис. 5, а та б, а). У плазмі крові щурів з ЦД вміст АОРР підвищувався у 1,7 раза, а вміст АГЕ – у 1,5 раза порівняно з контролем. За щоденного опромінення тварин з ЦД відбувалось зниження АОРР у 1,4 раза, а АГЕ у 1,9 раза порівняно зі значеннями у неопромієних діабетичних тварин (рис. 5, б та б, б).

**Обговорення.** Оксидативний стрес – це стан, що супроводжує велику кількість захворювань та є причиною розвитку різноманітних патологічних процесів. Тому не дивно, що вплив ФБМТ на розвиток оксидативного стресу є активно досліджуваною проблемою. Так, відомо, що ФБМТ сприяє зниженню вмісту продуктів ПОЛ, що утворюються при інтенсивних тренуваннях [14] або при старінні [15]. Встановлено, що ФБМТ викликає зниження вмісту АФО і підвищення рівня експресії генів, що відповідають за синтез СОД, каталази та глутатіонпероксидази у тканинах суглобів щурів із індукованим ревматоїдним артритом [16].

У результаті наших досліджень ми виявили зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, а також підвищення активності СОД у лейкоцитах при опроміненні тварин з ЦД.

СОД і каталаза забезпечують одну з перших ліній захисту клітин від агресивної дії вільних радикалів. СОД відіграє важливу роль у захисті клітин від дії супероксид-аніон радикала, запобігаючи процесам ПОЛ, що стабілізує клітинні мембрани та знижує рівень  $O_2^-$ . Базуючись на отриманих нами результатах, ми припускаємо, що при опроміненні вміст ТБК-позитивних продуктів знижується опосередковано через активацію ферментів антиоксидантного захисту. Це узгоджується з ефектами ФБМТ, що описані в літературі, зокрема з тим, що світ-



лове випромінювання здатне впливати на активність каталази, СОД і глутатіонпероксидази [17]. Відомо, що низькоінтенсивне світлове випромінювання з використанням світлодіодів (довжина хвилі 670 нм) викликає підвищення активності каталази у нирках, а СОД, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази у печінці щурів з ЦД [18, 19]. Однак механізми, що викликають таке підвищення активності остаточно не з'ясовані. Для електромагнітного випромінювання видимого спектра низької потужності фотони повинні поглинатися молекулярними хромофорами або фотоакцепторами. Один із можливих механізмів дії ФБМТ на клітинному рівні базується на поглинанні низькоінтенсивного випромінювання компонентами дихального ланцюга. Цитохром с оксидаза вважається первинним акцептором для світла червоного діапазону спектра в клітинах ссавців, оскільки для цього ферменту відомо 4 піки поглинання світла: 613,5–623,5 нм; 667,5–683,7 нм; 750,7–772,3 нм; 812,5–846,0 нм. Ці піки збігаються із спектрами дії, що описані у літературі (action spectra) – діапазонами електромагнітного випромінювання, при опроміненні якими спостерігається біологічна відповідь [20], а також з довжиною хвилі випромінювання нашого приладу. Поглинання фотонів молекулами цитохром с оксидази призводить до виникнення електронно-збуджених станів і тому може призвести до прискорення переносу електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій. Внаслідок прямої активації цитохром с оксидази під дією світла відбувається збільшення концентрації АТФ, цАМФ,  $Ca^{2+}$  та АФО, з подальшою активацією транскрипційних факторів, необхідних для ефективної клітинної відповіді. Серед них виділяють AP-1 (або Jun/Fos) і ядерний фактор NF- $\kappa$ B, які відіграють ключову роль у активації проліферації та диференціації клітин [24–27].

Ми припускаємо, що виявлені нами зміни у активності СОД можна пояснити впливом світла на вищевказані фактори транскрипції, що веде до підвищення експресії гена, що кодує цей ензим, а також прямою активацією, адже СОД містить іони металів ( $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) [28]. Наявність таких структур у молекулі фермента робить його потенційним хромофо-

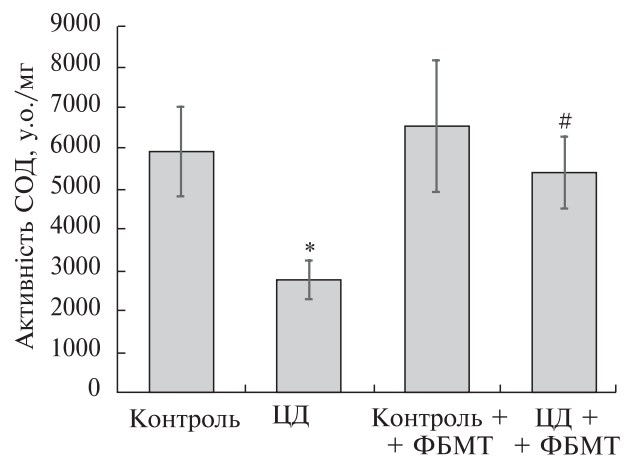


Рис. 3. Активність СОД (супероксиддисмутази) у лізатах лейкоцитів, у.о./мг. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $P < 0,05$ ; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД,  $P < 0,05$

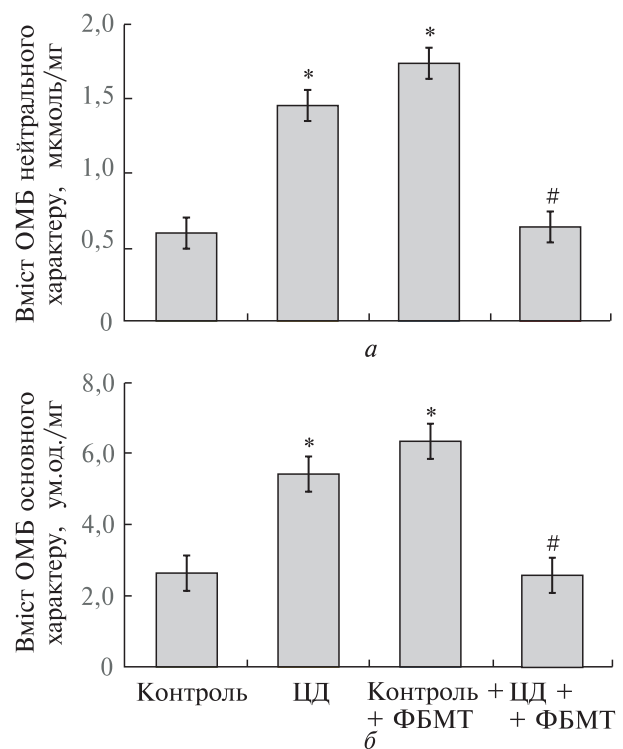


Рис. 4. Вміст ОМБ нейтрального (а) та основного (б) характеру у лізатах лейкоцитів. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $P < 0,05$ ; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД,  $P < 0,05$

ром, що може переходити у збуджений стан після поглинання випромінювання.

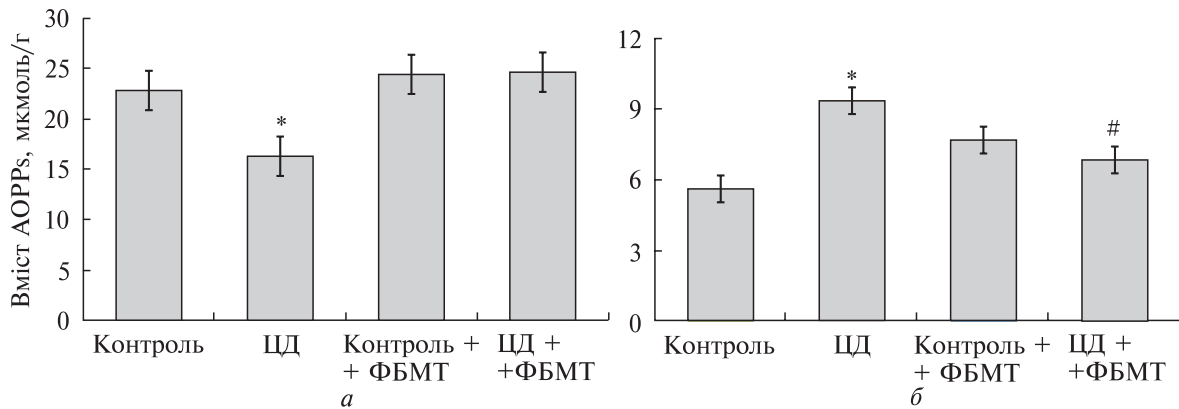


Рис. 5. Вміст АОРРс у лізатах лейкоцитів (а) та плазмі крові (б), мкмоль/г білка. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $P < 0,05$ ; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД,  $P < 0,05$

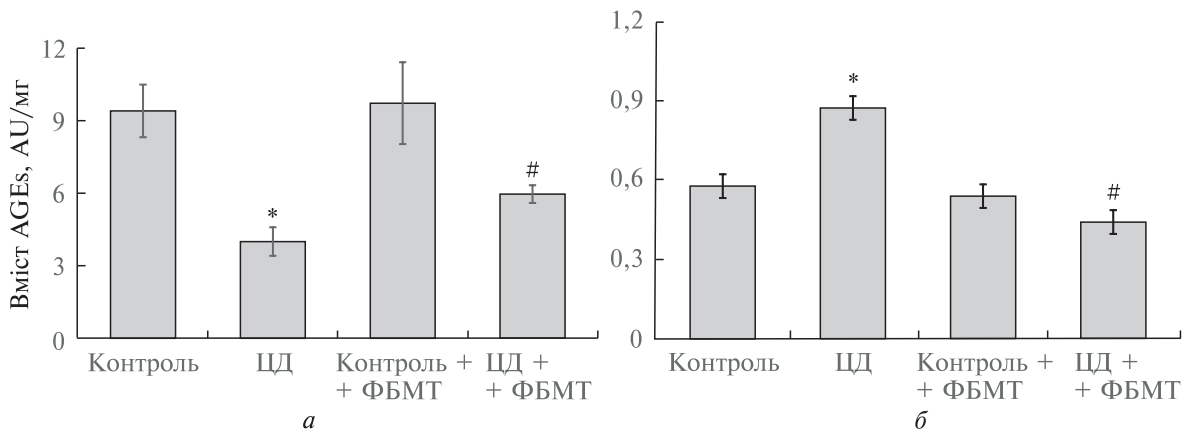


Рис. 6. Вміст АGEs у лізатах лейкоцитів (а) та плазмі крові (б), АУ/мг білка. \* – різниця вірогідна порівняно з контролем,  $P < 0,05$ ; # – різниця вірогідна порівняно з ЦД,  $P < 0,05$

Одним із найважливіших наслідків розвитку окисативного стресу за умов ЦД є процеси окисної модифікації білків. Така модифікація тісно пов'язана з генерацією АФО і їхніх похідних, які спричиняють утворення додаткових альдегідних чи кетонних груп. Наприклад, окиснення аргініну, лізину, треоніну та проліну під дією АФО або утворення карбонільних груп при взаємодії залишків лізину, гістидину та цистеїну з продуктами ПОЛ чи з продуктами окиснення вуглеводів. Утворення карбонільних груп у білках призводить до втрати їхніх біологічних функцій і збільшує чутливість до протеолітичної деградації [29].

У наших дослідженнях ми виявили зниження вмісту ОМБ при опроміненні тварин з ЦД. Ми припускаємо, що ФБМТ за ЦД, впливаючи

на активність ферментів антиоксидантного захисту, зменшує рівень вільних радикалів і, як наслідок, знижує інтенсивність окисної модифікації білків.

Хронічна гіперглікемія та надмірна продукція АФО при ЦД також спричиняє утворення АОРРс та АGEs. АОРРс в основному виникають під впливом хлорвмісних сполук – продуктів мієлопероксидазної активності нейтрофілів у відповідь на утворення  $H_2O_2$ , що призводить до окиснення залишків тирозину, які є особливо чутливими та легко перетворюються в дитирозин, а також обумовлюють утворення поперечних зв'язків та білкових агрегатів [30].

Мієлопероксидазна реакція, в результаті якої утворюється гіпохлоритна кислота, є одним із головних компонентів «респіраторного

вибуху» нейтрофілів – механізму, призначеного знищувати фагоцитовані патогенні мікроорганізми. Однак, за умов оксидативного стресу, дії хлорвмісних оксидантів також можуть піддаватися структури організму-хазяїна. Зокрема, було показано, що основною мішенню дії таких оксидантів у крові є сироватковий альбумін, тобто саме цей білок є основним джерелом кінцевих продуктів оксидації білків, вміст яких може підвищуватися при патологіях, пов'язаних із оксидативним стресом [31].

У результаті наших досліджень ми виявили підвищення вмісту АОРРс у плазмі щурів з ЦД, а за дії ФБМТ їхній вміст знижувався. Цей ефект опромінення можна пояснити загальною антиоксидантною дією світла, оскільки виявлене нами підвищення активності СОД за дії ФБМТ веде до зменшення рівня АФО.

Цікаво, що за умов ЦД у лізатах лейкоцитів ми виявили знижений вміст АОРРс. На нашу думку, це можна пояснити зниженням продукції гіпохлоритної кислоти – головного чинника утворення АОРРс, за рахунок зниження активності СОД та зменшення надходження  $H_2O_2$  до мієлопероксидазної реакції.

AGEs – це продукти неферментативних реакцій глікозилювання аміногруп білків цукрами (альдозами або кетозами). Вони складають групу більш ніж 20 гетерогенних сполук, найбільш поширеними серед яких є пентозидин і N-карбоксиметилізін [32]. Модифікації за участі AGEs призводять до незворотних перебудов структури білкових молекул та втрати їхніх функцій [33].

За умов ЦД у лейкоцитах ми виявили зниження вмісту AGEs. Одним із можливих механізмів, що пояснюють цей ефект є зниження вмісту глюкози всередині клітини через сповільнення або повну зупинку транслокації везикул з транспортером глюкози GLUT3 до плазматичної мембрани, що спричинене гіпоінсулінемією за ЦД. У лейкоцитах виявлені три типи транспортерів глюкози GLUT1, GLUT3 і GLUT4. GLUT1 володіє низькою афінністю до глюкози, і переважно транспортує L-дегідраскорбінову кислоту, в той час як GLUT3 і GLUT4 є інсулінозалежними, тому не здатні транспортувати глюкозу за умов гіпоінсулінемії, оскільки не відбувається їхня транслокація і експонування на плазматичній мембрані [35].

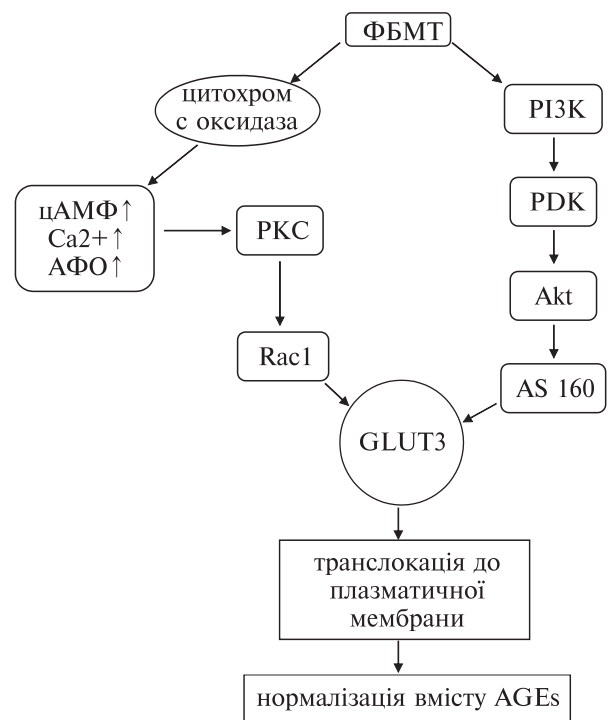


Рис. 7. Схема можливого механізму покращення транспорту глюкози та нормалізації рівня AGEs у лейкоцитах за умов ЦД. PI3K – фосфатидилінозитол-3-кіназа; PDK – фосфоінозитолзалежна протеїнкіназа; Akt – протеїнкіназа B; PKC – протеїнкіназа C. (адаптовано з [34], [37], [38])

Окрім цього, існують дослідження, котрі демонструють зниження експресії генів глюкозних транспортерів (зокрема GLUT3) у лейкоцитах при підвищених концентраціях глюкози у плазмі крові пацієнтів з ЦД 2-го типу [36].

Про покращення транспорту глюкози всередину лейкоцитів можуть свідчити отримані нами дані про нормалізацію вмісту AGEs у лейкоцитах крові тварин з ЦД після дії ФБМТ. ФБМТ через активацію синтезу АТФ, цАМФ та АФО за рахунок інтенсифікації окисного фосфорилування у мітохондріях здатна опосередковано впливати на сигнальний шлях NF-κB та активність протеїнкінази C (PKC). Відомо, що PKC здатна фосфорилувати білок Rac1, який за рахунок ремоделювання актину сприяє транслокації везикул з GLUT4. Щодо GLUT3, то наразі існує мало відомостей про механізм його транслокації до плазматичної мембрани, однак базуючись на даних, що GLUT3 вези-

кули подібно до GLUT4 вимагають активації Akt, опосередкованої PI-3-кіназою, припускають, що процес транслокації цих транспортерів є подібним [37; 38]. На нашу думку, активація PKC під дією світла сприяє процесу транслокації GLUT3 до плазматичної мембрани та підвищення надходження глюкози у лейкоцити (рис. 7.). Окрім того, у нашій попередній роботі ми запропонували механізм цукрознижувальної дії ФБМТ за рахунок активації рецепторних тирозинкіназ, PI3-кінази та протеїнкінази B (Akt1) [4]. Відомо, що активація цих ферментів також сприяє транслокації везикул з транспортерами глюкози до плазматичної мембрани через фосфорилування білка AS 160 (Akt substrate, 160 kDa), що відповідає за спрямування везикул до плазматичної мембрани [39].

В той час як у лейкоцитах рівень AGEs при ЦД знижувався, а при дії ФБМТ підвищувався, у плазмі крові щурів з ЦД ми виявили підвищення рівня AGEs та AOPPs (рис. 5, б та 6, б). Це підтверджує наявні в літературі дані, що ці маркери свідчать про хронічну гіперглікемію та розвиток оксидативного стресу [40]. За дії ФБМТ ми спостерігали зниження цих показників у плазмі крові тварин з ЦД, що може свідчити про перерозподіл глюкози та про антиоксидантну дію опромінення, адже подібні результати були отримані нашими колегами при дослідженні поліфенольних сполук із *Cornus mas* L., які володіють потужними антиоксидантними властивостями [41].

**Висновки.** Отримані нами результати демонструють позитивний вплив ФБМТ на стан системи антиоксидантного захисту у лейкоцитах крові щурів з експериментальним цукровим діабетом. Ми припускаємо, що виявлене нами підвищення активності одного з ключових ферментів антиоксидантного захисту СОД сприяє зниженню рівня оксидативного стресу, що виявляється у зменшенні вмісту ТБК-позитивних продуктів, карбонільних груп білків, а також нормалізації вмісту AOPPs у лейкоцитах і плазмі крові. Однак, точний механізм такого впливу ФБМТ на активність ферментів залишається невідомим, хоча основною є теорія про активацію цитохром с оксидази та підвищення активності електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Зниження рівня AGEs у

плазмі крові щурів з ЦД з одночасною нормалізацією цього показника у лейкоцитах хворих тварин після опромінення свідчить про перерозподіл глюкози шляхом покращення її транспорту у лейкоцити.

**Дотримання етичних стандартів.** При роботі з тваринами дотримувалися положення про «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах», ухваленим Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансових установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

#### THE EFFECT OF PHOTOBIO-MODULATION THERAPY ON OXIDATIVE STRESS PROGRESSING IN BLOOD LEUKOCYTES OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

O.I. Karmash, M.Ya. Liuta,  
A.M. Korobov, N.O. Sybirna

Department of Biochemistry, Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine;  
Laboratory of Quantum Biology and Quantum Medicine, V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine.

E-mail: sashakarmash@gmail.com

Oxidative stress is one of the main reasons of severe complications development during diabetes mellitus (DM). Modern pharmacological drugs are able to lower blood glucose level but seldom possess antioxidant properties. There is data about broad specter of biological activity of photobiomodulation therapy (PBM therapy). Potential ability to decrease blood glucose concentration and antioxidant activity give this type of therapy a perspective application in treatment of DM and its complications. The effect of PBM therapy on antioxidant protection system of blood leukocytes in rats with streptozotocin-induced DM was studied. Established that irradiation of rats with DM cause the increasing of superoxide dismutase activity and normalization of oxidative stress markers (TBA-positive products, oxidatively modified proteins and advanced glycation end products).



ВЛИЯНИЕ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИОННОЙ ТЕРАПИИ НА РАЗВИТИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ КРЫС С СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.

О.И. Кармаш, М.Я. Люта,  
А.М. Коробов, Н.А. Сибирная

Оксидативный стресс – одна из главных причин развития тяжелых осложнений при сахарном диабете (СД). Современные фармакологические препараты, хотя и способны снижать уровень глюкозы, редко проявляют антиоксидантные свойства. Существуют данные о широком спектре биологической активности фотобиомодуляционной терапии (ФБМТ). Потенциальные сахароснижающее и антиоксидантное действия делают этот тип терапии перспективным в применении для лечения СД и его осложнений. Проведено исследование влияния ФБМТ на состояние системы антиоксидантной защиты лейкоцитов крови крыс из стрептозотокцин-индуцированным СД. Установлено, что у крыс с СД при облучении происходит повышение активности супероксиддисмутазы и нормализация содержания маркеров оксидативного стресса (ТБК-положительных продуктов, окислительно-модифицированных белков и конечных продуктов гликации белков).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Elbe, H., Vardi, N., Esrefoglu, M., Ates, B., Yolglu, S., and Taskapan, C., Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2015, vol. 34, no. 1, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1177/0960327114531995>.
2. Evan, D.H., Abrahamse, H., Efficacy of three laser wavelengths for in vitro wound healing, *Photodermat. Photoimm. Photomed.*, 2008, vol. 24 no. 4, pp. 199–210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2008.00362.x>.
3. Chung H., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D., Hamblin M.R., The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy, *Ann. Biomed. Eng.*, 2012, vol. 40, no. 2, pp. 516–33. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>.
4. Karmash, O.I., Liuta, M.Y., Yefimenko, N.V., Korobov, A.M., Sybirna, and N.O., The influence of low-level light radiation of red spectrum diapason on glycemic profile and physicochemical characteristics of rat's erythrocytes in diabetes mellitus, *Fiziologichnyi Zhurnal*, 2018, vol. 64, no. 6, pp. 68–76. <https://doi.org/10.15407/fz64.06.068>.
5. Denadai, A.S., Aydos, R.D., Silva, I.S., Olmedo, L., de Senna Cardoso, B.M., da Silva B.A.K., de

- Carvalho P.T.C., Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds, *J. Exp. Ther. Oncol.*, 2017, vol. 11, no. 2, pp. 85–9.
6. Korolyuk, M.A., Ivanova, I.H., and Maiorova, I.H., Method for the determination of catalase activity., *Lab. Delo.*, 1988, no. 1, pp. 16–9.
7. Hnatysh, A.R., Drel, V.R., Yalaneckyy, A.Ya., Mizin, V.I., Zagoruyko, V.A., Gerzhykova, V.G., and Sybirna, N.O., The antioxidant effect of natural polyphenolic complexes of grape wine in the rat retina under streptozotocin-induced diabetes mellitus., *Biol. Stud.*, 2011, vol. 5, no. 2, pp. 61–72. <https://doi.org/10.30970/sbi.0502.156>.
8. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–75.
9. Meshchysyn, I.F., Method for the determination of proteins oxidative modification, *Bukov. Med. Visn.*, 1999, no. 1, pp. 196–205.
10. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., and Descamps-Latscha, B., Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int.*, 1996, vol. 49, no. 5, pp. 1304–13. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>.
11. Kalousová, M., Skrha, J., and Zima, T., Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus, *Physiol. Res.*, 2002, vol. 51, no. 6, pp. 597–604.
12. Putta, Swathi, Eswar, Kilari, A review on methods of estimation of advanced glycation end products, *World J. Pharmac. Res.*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 689–99.
13. Timirbulatov, R.A., Selesnev, E.I., Method for increasing the free-radical oxidation of lipid-containing blood components and its' diagnostical meaning, *Lab. Delo*, 1981, no. 4, pp. 209–11.
14. De Marchi, T., Leal Junior, E.C., Bortoli, C., Tomazoni, S.S., Lopes-Martins, R.A., and Salvador, M., Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med. Sci.*, 2012, vol. 27, no. 1, pp. 231–6. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0955-5>.
15. Guaraldo, S.A., Serra, A.J., Amadio, E.M., Antônio, E.L., Silva, F., Portes, L.A., Tucci, P.J.F., Leal-Junior, E.C.P., and Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise, *Lasers Med. Sci.*, 2016, vol. 31, no. 5, pp. 833–40. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1882-2>.

16. Dos Santos, S.A., Dos Santos Vieira, M.A., Simxes, M.C.B., Serra, A.J., Leal-Junior, E.C., and de Carvalho, P.T.C., Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model, *Lasers Med. Sci.*, 2017, vol. 32, no. 5, pp. 1071–9. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2209-7>.
17. Ibuki, F.K., Simxes, A., Nicolau, J., and Nogueira, F.N., Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats, *Lasers Med. Sci.*, 2013, vol. 28, no. 3, pp. 911–8. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1173-5>.
18. Lim, J., Ali, Z.M., Sanders, R.A., Snyder, A.C., Eells, J.T., Henshel, D.S., Watkins, J.B., Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats. *Biochem. Mol. Toxicol.*, 2009, vol. 23, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1002/jbt.20257>.
19. Lim, J., Sanders, R.A., Snyder, A.C., Eells, J.T., Henshel, D.S., and Watkins, J.B., Effects of low-level light therapy on streptozotocin-induced diabetic kidney, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2010, vol. 99, no. 2, pp. 105–10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.03.00>.
20. Hamblin, M.R., Demidova, T.N., Mechanisms of Low-Level Light Therapy, *Proc. SPIE*, 2006, vol. 6140, no. 1, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1117/12.646294>.
21. Karu T., Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent?, *Photomed. Laser Surg.*, 2013, vol. 31, no. 5, pp. 189–91. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3510>.
22. Chen, C.H., Wang, C.Z., Wang, Y.H., Liao, W.T., Chen, Y.J., Kuo, C.H., Kuo, H.F., and Hung, C.H., Effects of low-level laser therapy on M1-related cytokine expression in monocytes via histone modification. *Mediat. Inflamm.*, 2014, vol. 2014, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/625048>.
23. Drel, V.R., Sybirna, N., Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats, *Cell Biol. Int.*, 2010, vol. 34, no. 12, pp. 1147–53. <https://doi.org/10.1042/CBI20100201>.
24. Lima, P.L.V., Pereira, C.V., Nissanka, N., Arguello, T., Gavini, G., Maranduba, C.M.D.C., Diaz, F., and Moraes, C.T., Photobiomodulation enhancement of cell proliferation at 660 nm does not require cytochrome c oxidase. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2019, vol. 194, pp. 71–5. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.03.015>.
25. Amaroli, A., Ferrando, S., and Benedicenti, S., Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue, *Photochem. Photobiol.*, 2019, vol. 95, no. 1, pp. 455–9. <https://doi.org/10.1111/php.13032>.
26. Martin, K.R., Barrett, J.C., Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2002, vol. 21, no. 2, pp. 71–5. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht2130a>.
27. Sperandio, F.F., Giudice, F.S., Corrka, L., Pinto, D.S. Jr., Hamblin, M.R., and de Sousa, S.C, Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway, *J. Biophotonics.*, 2013, vol. 6, no. 10, pp. 839–47. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300015>.
28. Batinic-Haberle, I., Tovmasyan, A., Roberts, E.R., Vujaskovic, Z., Leong, K.W., and Spasojevic, I., SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways, *Antioxid. Red. Signal.*, 2014, vol. 20, no. 15, pp. 2372–415. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5147>.
29. Ellis, E.M., Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention, *Pharmacol. Therapeut.*, 2007, vol. 115, no. 1, pp. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.015>.
30. Qian Wu, Zhao-Ming Z., Ying P., Ji-Huan Z., Shuai Zheng, Si-Yuan Zhu, and Jian-Ting Chen, Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Postmenopausal Osteoporosis, *Med. Sci. Monit.*, 2015, vol. 21, pp. 2428–32. <https://doi.org/10.12659/MSM.894347>.
31. Bochi, G.V., Torbitz, V.D., de Campos, L.P., Sangoi, M.B., Fernandes, N.F., Gomes, P., Moretto, M.B., Barbisan, F., da Cruz, I.B., and Moresco, R.N., In Vitro Oxidation of Collagen Promotes the Formation of Advanced Oxidation Protein Products and the Activation of Human Neutrophils, *Inflammation*, 2016, vol. 39, no. 2, pp. 916–27. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0325-3>.
32. Merhi, Z., Kandaraki, E.A., and Diamanti-Kandaraki, E., Implications and Future Perspectives of AGEs in PCOS Pathophysiology, *Trends Endocrinol. Metab.*, 2019, vol. 30, no. 3, pp. 150–62. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.01.005>.
33. Deluyker, D., Evens, L., and Bito, V., Advanced glycation end products (AGEs) and cardiovascular dysfunction: focus on high molecular weight AGEs, *Amino Acids*, 2017, vol. 49, no. 9, pp. 1535–41. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2464-8>.
34. Huang, L., Jiang, X., Gong, L., Xing, D., Photo-activation of Akt1/GSK3 $\beta$  Isoform-Specific Signaling Axis Promotes Pancreatic  $\beta$ -Cell Regeneration, *J. Cell Biochem.*, 2015, vol. 116, no. 8, pp. 1741–54. <https://doi.org/10.1002/jcb.25133>.

35. Vrhovac, I., Breljak, D., and Sabolić, I., Glucose transporters in the mammalian blood cells, *Periodic. Biologor.*, 2014, vol. 116, no. 2, pp. 131–8.
36. Kipmen-Korgun, D., Bilmen-Sarikcioglu, S., Altunbas, H., Demir, R., and Korgun, E.T., Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2009, vol. 69, no. 3, pp. 350–8. <https://doi.org/10.1080/00365510802632163>.
37. Simpson, I.A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K.H., Travis, A., and Vannucci, S.J., The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008, vol. 295, no. 2, pp. 242–53. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90388.2008>.
38. Ueda-Wakagi, M., Hayashibara, K., Nagano, T., Ikeda, M., Yuan, S., Ueda, S., Shirai, Y., Yoshida, K.I., and Ashida, H., Epigallocatechin gallate induces GLUT4 translocation in skeletal muscle through both PI3K- and AMPK-dependent pathways, *Food Funct.*, 2018, vol. 9, no. 8, pp. 4223–33. <https://doi.org/10.1039/C8FO00807H>.
39. Krook, A., Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J.R., Sending the Signal: Molecular Mechanisms Regulating Glucose Uptake, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2004, vol. 36, no. 7, pp. 1212–7. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000132387.25853.3B>.
40. Thomas, M.C., Forbes, J.M., and Cooper, M.E., Advanced glycation end products and diabetic nephropathy, *Am. J. Ther.*, 2005, vol. 12, no. 6, pp. 562–72. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000077413.41276.17>.
41. Dzydzan, O., Bila, I., Kucharska, A.Z., Brodyak, I., and Sybirna, N., Antidiabetic effects of extracts of red and yellow fruits of cornelian cherries (*Cornus mas L.*) on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Food Funct.*, 2019, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1039/C9FO00515C>.

Надійшла в редакцію 06.12.19  
Після доопрацювання 19.02.20  
Прийнята до друку 18.09.20