

ВПЛИВ WGA-СТИМУЛОВАЛЬНИХ СИГНАЛІВ НА ПРОЦЕС ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ АКТИНУ ЛЕЙКОЦИТІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

І. Бродяк, І. Біла, Н. Сибірня

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: iryna_brodyak@yahoo.com*

Досліджено процес полімеризації актину лейкоцитів після їхньої преінкубації упродовж 30 секунд, однієї та трьох хвилин зі сіалоспецифічним лектином зародків пшениці (WGA) у контрольній групі тварин і за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД). З'ясовано, що в контрольній групі тварин преінкубація лейкоцитів із лектином WGA обумовлює достовірне зростання рівня F-актину, пік полімеризації якого припадає на першу хвилину. У тварин з ЕЦД динаміка стимуляції лектином WGA теж приводить до формування відповіді на 1 хв і деполімеризації актину на 3 хв, проте ступінь полімеризації актину був достовірно нижчим порівняно з контрольною групою тварин. Зміни на рівні *реорганізації актинового цитоскелету* в результаті полімеризації-деполімеризації актину зумовлені порушенням трансдукції лектиніндукованого сигналу через сіаловмісні глікокон'югати мембран лейкоцитів, кількість і структура яких за умов ЕЦД є зміненою.

Ключові слова: актин, сіаловмісні глікокон'югати, лейкоцити, експериментальний цукровий діабет.

Порушення функціонального стану лейкоцитів крові за умов цукрового діабету (ЦД) супроводжується зміною гліканового профілю плазматичних мембран цих клітин крові. Термінальну позицію у структурі олігосахаридних ланцюгів поверхневих глікокон'югатів переважно займають сіалові кислоти. Як компонент рецепторів сіалові кислоти модулюють широкий спектр фізіологічних і патологічних процесів. Зокрема, вони регулюють молекулярно-клітинні взаємодії, трансдукцію клітинних сигналів і транспортування молекул крізь плазматичні мембрани. Модифікація олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнових рецепторів клітин крові призводить до порушення сприймання сигналів із мікрооточення і міжклітинних взаємодій, зокрема, дисфункції адгезивної, агрегаційної та міграційної здатності лейкоцитів [17–19].

Попередніми нашими дослідженнями було встановлено [2], що розвиток експериментального ЦД (ЕЦД) супроводжується зменшенням вмісту сіаловмісних глікокон'югатів у складі мембран лейкоцитів. Десіалювання зазнають залишки цукрів, які приєднанні як $\alpha 2,3$ -, так і $\alpha 2,6$ -глікозидним зв'язком до субтермінальних моносахаридів у структурі гліканів. Кількість N-зв'язаних гліканів на поверхні лейкоцитів у цьому разі не змінюється, а вміст O-гліканів незначно зростає, тому зменшення вмісту сіалових кислот у глікокаліксі лейкоцитів за умов ЕЦД ми пояснили посиленням десіалюванням мембранних гліканів.

У свою чергу, морфофункціональний стан лейкоцитів узалежнений від комплексної взаємодії між білками мембрани і цитоскелетом, які задіяні в організації та координації сигнальних мереж, у забезпеченні специфічності й інтенсивності внутрішньоклітинного сигналювання [6, 11]. Реорганізація актинового цитоскелету в результаті полімеризації-деполімеризації актину має важливе значення для здійснення локомоторних функцій лейкоцитів і є ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності лейкоцитів [10, 14, 19].

У разі дії стимулювальних чинників лейкоцити активуються, внаслідок чого відбувається швидка полімеризація актинових філаментів із наявних у клітині мономерів G-актину [9]. Дослідження рівня полімеризації актину в лейкоцитах периферичної крові дають змогу детально охарактеризувати їхню преміграційну здатність перед тим, як вони залишать кровотік, тобто перед діapedезом.

З огляду на літературні дані та результати власних попередніх досліджень, метою нашої роботи було дослідити вплив WGA-стимулювальних сигналів на процес полімеризації актину в лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД для з'ясування молекулярних механізмів, які опосередковують зміни їхнього функціонального стану за досліджуваних умов. Для вирішення поставлених перед нами завдань, застосовуючи метод флуоресцентної мікроскопії, аналізували рівень F-актину за умов 30 секунд, однієї та трьох хвилин преактивації лейкоцитів способом інкубації зі сіалоспецифічним лектином зародків пшениці (WGA).

Матеріали та методи

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

Тварини були поділені на дві групи: перша – контроль (К), друга – тварини з ЕЦД. Експериментальний ЦД викликали внутрішньоочеревинним 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 у 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 понад 14 мМ.

Щурів усіх дослідних груп декапітували під ефірним наркозом на 15-й день експерименту. Забір крові для досліджень проводили з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100). З гепаринізованої крові виділяли лейкоцити у градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho=1,076-1,078$ г·см⁻³) способом центрифугування за 630 г упродовж 35 хв. Отримані клітини двічі відмивали у забуференому Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ фізіологічному розчині (ЗФР) (рН 7,4) упродовж 5 хв за 850 g. Життєздатність клітин у тесті із трипановим синім становила не менше 98 %. Після підрахунку клітин проводили інкубацію суспензії лейкоцитів упродовж певного проміжку часу (0,5 хв, 1 хв, 3 хв) з лектином WGA (лектин зародків пшениці, специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну і N-ацетилнейрамінової кислоти) у концентрації 32 мкг/мл. Методом флуоресцентної мікроскопії із застосуванням phalloidin-Alexa Fluor 350 оцінювали рівень (за інтенсивністю свічення) F-актину в лейкоцитах щурів досліджуваних груп тварин [7]. Оцифровані результати інтенсивності сигналів флуоресцентної мікроскопії на знімках представляють середнє арифметичне значення інтенсивності свічення однієї клітини, яке виражали в у.о. 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 експериментальних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p \geq 0,95$, $p \geq 0,99$, $p \geq 0,999$.

Результати і їхнє обговорення

За рівнем флуоресценції фалоїдину, який зв'язує F-актин у співвідношенні 1:1, не зв'язуючи при цьому G-актин [9], ми оцінили вихідний рівень полімеризованого актину в

лейкоцитах периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД (рис. 1). Аналізуючи результати проведених досліджень (рис. 2А), встановили, що рівень F-актину в лейкоцитах крові за ЕЦД був достовірно вищим порівняно з контрольною групою тварин. Це вказує на їхній преактивований стан і зміну структурно-функціональних властивостей цих клітин у разі діабету [7]. Преактивований стан лейкоцитів характеризується формуванням на поверхні клітини значної кількості коротких псевдоподій [13]. Тому виявлене нами п'ятикратне зростання рівня F-актину в лейкоцитах за умов ЕЦД (рис. 2А) вказує на те, що у стані преактивації лейкоцитів полімеризований актин сконцентрований саме у зоні псевдоподій [13]. Зростання рівня полімеризованого актину хоча б утрічі призводить до дефекту у відповіді клітини під час інтегрин-залежної взаємодії, внаслідок чого знижується адгезія типу клітина-матрикс [3, 12, 19]. Тому ми можемо припустити, що у разі ЕЦД збільшення рівня полімеризації актинових філаментів обумовлює послаблення адгезії лейкоцитів з ендотеліальними клітинами та порушення у процесі проникнення лейкоцитів через судини [5].

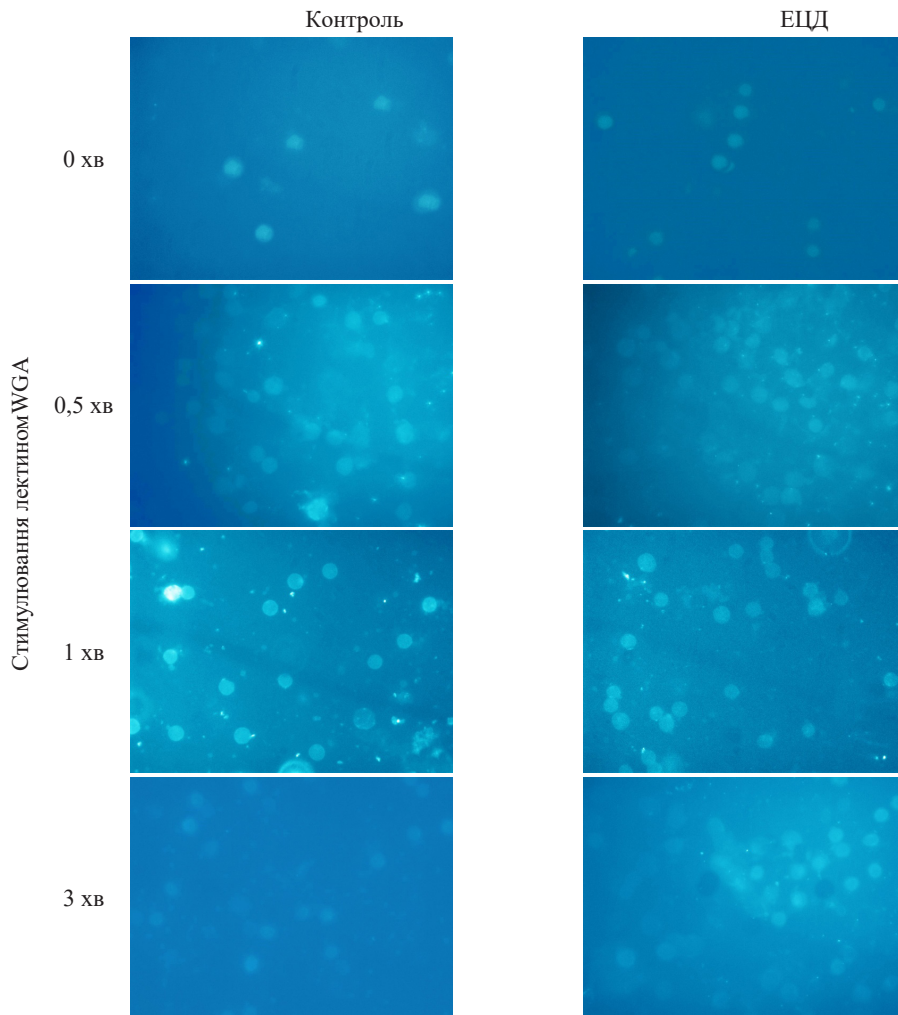


Рис. 1. Репрезентативні мікрофотографії флуоресцентної мікроскопії лейкоцитів демонструють інтенсивності свічення актину після фіксування, пермеабілізування й інкубування клітин з Phalloidin Alexa Fluor 350 у досліджуваних групах тварин. Збільшення $\times 1000$

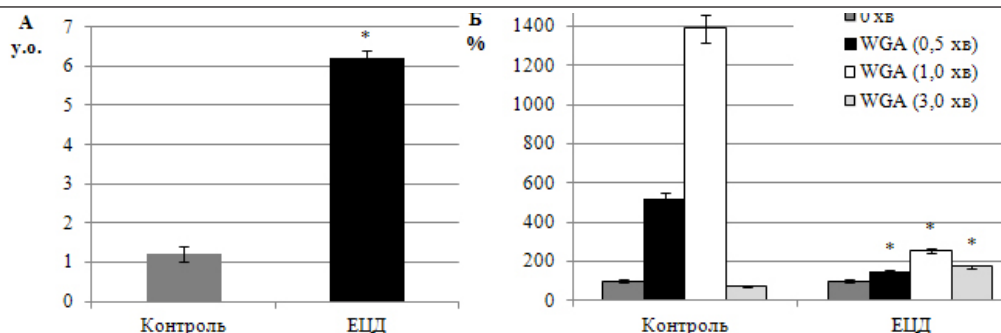


Рис. 2. Вміст полімеризованого актину (за результатами флуоресцентної мікроскопії) в лейкоцитах щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету ($M \pm m$, $n = 4-5$): А – абсолютні значення без стимулювання; Б – абсолютні значення (0 хв) в контролі та за умов ЕЦД прийнято за 100 %; вихідні значення стимулювального ефекту лектину WGA виражено у % щодо 100 % без стимулювання; * – різниця вірогідна порівняно з контролем

Щоб з'ясувати зміни у системі адгезивних взаємодій типу клітина-матрикс чи клітина-клітина, ми проводили преінкубацію лейкоцитів із лектином WGA. У проведення WGA-стимульовального сигналу в лейкоцити задіяні рецептори, які у термінальній позиції олігосахаридних ланцюгів поверхневих глікокон'югатів містять сіалові кислоти. У контрольній групі тварин динаміка стимуляції лектином WGA вказує на чітко виражений пік полімеризації актину на 1 хв і його деполімеризацію на 3 хв (рис. 2Б). Очевидно, включення сигнальної мережі, що приводить до реорганізації цитоскелету цих клітин, у таких експериментальних умовах саме відбувалося на відмітці – 1 хв. У разі діабету чітко простежується затримка формування передачі зовнішнього імпульсу після дії сіалоспецифічного лектину, що виявлялось у незначному посиленні процесів полімеризації актину на 30-ту секунду (рис. 1 і 2Б). У тварин з ЕЦД стимульовальний ефект лектину WGA теж приводив до формування піку полімеризації актину на 1 хв, проте вміст F-актину був у 5,5 разу нижчим порівняно з контрольною групою тварин (рис. 1 і 2Б). Зменшення вмісту F-актину в 1,5 разу на третю хвилину відображає незавершений процес деполімеризації актинових філаментів. Низький рівень полімеризації актину в разі преінкубації лейкоцитів зі сіалоспецифічним лектином WGA можна пояснити як вихідним станом преактивованості лейкоцитів за діабету, так і змінами структури та кількості сіаловмісних гліканів на поверхні мембран лейкоцитів [2]. Отримані результати узгоджуються з нашими попередніми дослідженнями [1], в яких було встановлено, що у лейкоцитах периферичної крові за умов ЦД 1 типу є надзвичайно сповільнений і розрегульований фосфатидилінозитол-3-кіназний (PI-3)-К сигнальний шлях, що й обумовлює затримку трансдукції стимульовального імпульсу після дії сіалоспецифічного лектину. Серед клітинних білків-мішеней для PI-3-кінази є низькомолекулярні GTPази, що беруть участь у реалізації такої клітинної відповіді на зовнішнє подразнення, як формування стресових фібрил, утворення ламелоподій і філоподій, тобто зміни морфологічного стану клітини і забезпеченні міграційної здатності лейкоцитів [4, 11, 15]. Зміна рівня полімеризації та деполімеризації актину в лейкоцитах у разі ЕЦД може вказувати на порушення у системі активації, хемотаксису, адгезії, фагоцитозу та прояву цитотоксичності, адже саме актиновий цитоскелет лейкоцита постійно реорганізується, виступаючи динамічною системою, яка визначає морфофункціональні зміни у клітині [8, 13, 16, 19].

За умов діабету структурно-функціональні зміни рецепторного апарату лейкоцитів і перехід цих клітин у преактивований стан послаблюють трансдукцію WGA-стимульовальних сигналів, які через зміну активності ензиму PI-3-кінази впливають на рівень полімеризації актину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сибірна Н. О., Здіорук М. І., Бродяк І. В. та ін. Активация фосфатидилінозитол-3-кіназного шляху лектиніндукованим сигналом через сіаловмісні глікопротеїни мембран лейкоцитів при цукровому діабеті 1-го типу // Український біохімічний журнал. 2011. Т. 83. № 5. С. 22–31.
2. Ференц І. В., Бродяк І. В., Люта М. Я., Сибірна Н. О. Структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікопротеїнів еритроцитарних мембран при введенні агматину за умов експериментального цукрового діабету // Цитологія і генетика. 2013. Т. 47. № 4. С. 69–79.
3. Advani A., Marshall S., Thomas T. Increasing neutrophil F-actin corrects CD11b exposure in Type 2 diabetes. // Eur. J. Clin. Invest. 2004. Vol. 34. № 5. P. 358–364.
4. Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T. et al. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase // Blood. 2008. Vol. 111. №3. P. 1497–1503.
5. Alba-Loureiro T.C., Munhoz C.D., Martins J.O. et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2007. Vol. 40. P. 1037–1044.
6. Algeciras-Schimmich A., Shen L., Barnhart B.C. et al. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95 // Mol. Cell Biol. 2002. Vol. 22. P.207–220.
7. Brodyak I. V., Bila I. I., Overchuk M., Sybirna N. O. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats // Studia Biologica. 2014. Vol. 8. № 3–4. С. 17–30.
8. Cano M. L., Cassimeris L., Fechheimer M., Zigmond S. H. Mechanisms Responsible for F-actin Stabilization after Lysis of Polymorphonuclear Leukocytes // The J. of Cell Biology. 1992. Vol. 116. №5. P. 1123–1134.
9. Carulli G., Mattii L., Azzara A. et al. Actin Polymerization in Neutrophils from Donors of Peripheral Blood Stem Cells: Divergent Effects of Glycosylated and Nonglycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor // American Journal of Hematology. 2006. Vol. 81. P. 318–323.
10. Cicchetti G., Allen P. G., Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2003. Vol. 13. P. 220–228.
11. Fais S., Malorni W. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions // J. of Leukocyte Biology. 2003. Vol. 73. P. 556–563.
12. Guo P., Zhang Y., Zhao J. H. et al. Regulation on the expression and N-glycosylation of integrins by N-acetylglucosaminyltransferase V // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 310. №2. P. 619–626.
13. Hannigan M., Zhan L., Ai Y., Huang C.-K. Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal reorganization in murine neutrophils *in vitro* // J. of Leukocyte Biology. 2001. Vol. 69. P. 497–504.
14. Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2003. Vol. 35. P. 1619–1638.
15. Nunoi H., Yamazaki T., Kanegasaki S. Neutrophil cytoskeletal disease // Int. J. Hematol. 2001. Vol. 74. № 2. P. 119–124.
16. Pollard T. D., Borisy G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // Cell. 2003. Vol. 112. P.453–465.
17. Samstag Y., Eibert S. M., Klemke M., Wabnitz G. H. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration // J. of Leukocyte Biology. 2003. Vol. 73. P. 30–48.
18. Tipu H. N., Ahmed T. A., Bashir M. M. Human Leukocyte Antigen Class II Susceptibility Conferring Alleles Among Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus Patients // J. of the College of Physicians and Surgeons Pakistan. 2011. Vol. 21. №1. P. 26–29.
19. Zarbock A., Kempf T., Wollert K. et al. Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing in inflammation // J. Mol. Med. (Berl.). 2012. Vol. 90. №4. P. 353–359.

INFLUENCE OF WGA-STIMULATORY SIGNALS ON ACTIN POLYMERIZATION IN LEUKOCYTES OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

I. Brodyak, I. Bila, N. Sybirna

Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: iryna_brodyak@yahoo.com

The process of actin polymerization in leukocytes was investigated after their pre-incubation with sialo-specific wheat germ lectin (WGA) during 30 s, 1 and 3 minutes in both healthy rats and model animals with experimentally induced diabetes mellitus (EDM). It was shown that pre-incubation of leukocytes with WGA lectin causes a significant increase in F-actin polymerization in the control group of animals. Peak of polymerization of actin was formed at the first minute of experiment. WGA stimulation also leads to the formation of the answer at the 1st minute and depolymerization of actin at the 3^d minute in animals with EDM, but the degree of actin polymerization was significantly lower than in the leukocytes of the healthy animals. Changes in the actin cytoskeleton on reorganization resulted in actin polymerization-depolymerization were caused by disturbance signal transduction through lectin-induced sialoglycoconjugates of leukocytes, quantity and structure of which was altered under the EDM conditions.

Keywords: actin, sialoglycoconjugates, leukocytes, experimental diabetes mellitus.

ВЛИЯНИЕ WGA-СТИМУЛИРУЮЩЕГО СИГНАЛА НА ПРОЦЕСС ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

I. Бродяк, И. Белая, Н. Сибирная

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

e-mail: iryna_brodyak@yahoo.com

Исследован процесс полимеризации актина лейкоцитов после их преинкубации в течение 30 секунд, одной и трех минут с сialogликоконъюгатами лектина зародышей пшеницы (WGA) в контрольной группе животных и в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭСД). Установлено, что в контрольной группе животных преинкубация лейкоцитов с лектином WGA обуславливает достоверный рост уровня F-актина, пик полимеризации которого приходился на первую минуту. У животных с ЭСД динамика стимуляции лектином WGA тоже приводит к формированию ответа на 1 мин и деполимеризации актина на 3 мин, однако степень полимеризации актина была достоверно ниже по сравнению с контрольной группой животных. Изменения на уровне реорганизации актинового цитоскелета в результате полимеризации-деполимеризации актина обусловлены нарушением трансдукции лектининдуцированного сигнала через сialogликоконъюгаты мембран лейкоцитов, количество и структура которых в условиях ЭСД является измененной.

Ключевые слова: актин, сialogликоконъюгаты, лейкоциты, экспериментальный сахарный диабет.