



УДК 611-018.53:577.171.6:577.112.85:379-008.64

УЧАСТЬ PI-3'-КИНАЗНОГО СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ У ВИЗНАЧЕННІ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ МЕМБРАН ЛЕЙКОЦИТІВ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ

М. І. Здіорук, І. В. Бродяк, Н. О. Сибірна

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

Досліджено агрегаційну здатність лейкоцитів крові здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1 типу та молекулярні механізми трансдукції сигналів через глікопротеїнові рецептори із залученням фосфатидилінозитол-3'-кінази, яка здійснює вплив на полімеризацію актинового цитоскелету досліджуваних клітин, що є ключовим моментом у забезпеченні міграційної здатності лейкоцитів.

Ключові слова: мононуклеарні лейкоцити, нейтрофільні гранулоцити, сіаловмісні глікопротеїни, лектиніндукована агрегація, фосфатидилінозитол-3'-кіназа, цукровий діабет 1 типу.

ВСТУП

За умов цукрового діабету (ЦД) відбувається виражений перерозподіл сіаловмісних вуглеводних детермінант у просторовій структурі глікопротеїнових рецепторів мембран лейкоцитів периферичної крові. Це може бути однією з причин порушення функціонального стану мононуклеарних та поліморфноядерних лейкоцитів і призводити до зміни агрегаційної й адгезивної здатності цих лейкоцитів крові при патології. Зміни у морфофункціональному стані лейкоцитів крові, які зумовлюють порушення їхньої взаємодії з ендотелієм судин, є етіологічною передумовою розвитку діабетичних ускладнень і хронічних захворювань, що погіршують стан хворих [6]. Дослідження агрегаційної здатності лейкоцитів слугує для моделювання передміграційного стану лейкоцитів перед їхнім виходом із русла крові, тобто перед здійсненням діapedезу [22]. Молекулярними зондами, що селективно активують рецептори до хемокінів, можуть виступати сіалоспецифічні лектини, а реакція на їхній вплив дає можливість робити висновки про тонку хімічну структуру вуглеводних детермінант глікопротеїнів на мембрані лейкоцитів.

Фосфатидилінозитол-3'-кіназа (PI-3'-кіназа) – це ключовий фермент, що бере участь у проведенні внутрішньоклітинного сигналу під час найрізноманітніших рецептор-опосередкованих клітинних відповідей, а також під час активації

нейтрофілів, моноцитів і лімфоцитів [2, 13, 19]. Активна PI-3'-кіназа є гетеродимерним ферментом, який складається із каталітичної субодиниці молекулярною масою 110 кДа (p110 δ) і регуляторної субодиниці з молекулярною масою 85 кДа (p85 α) [4, 10, 24]. PI-3'-кіназні субодиниці було клоновано і показано їхню колокалізацію з рецепторами плазматичної мембрани в цитозолі, у внутрішньоклітинних везикулах чи кавеолах [27]. PI-3'-кіназа є основним ліпофільним ферментом, який опосередковує внутрішньоклітинне ліпідне сигналювання при різних типах клітинної відповіді, зокрема при рецептор-опосередкованому ліпогенезі, активації нейтрофілів, транспортуванні глюкози, везикулярному транспортуванні, утворенні рафтів на мембрані, реорганізації цитоскелету [5].

Гіперглікемія за умов діабету викликає перехід лейкоцитів у преактивований стан, який значною мірою є результатом активації і транслокації PI-3'-кінази у цитоскелет, у сайти, які опосередковують інтегринзалежну фокальну адгезію клітин.

Метою даної роботи було вивчення за допомогою лектинів особливостей структури олігосахаридних компонентів глікопротеїнів поверхні лейкоцитів, відповідальних за зміну функціонального стану цих клітин (у нормі та за умов діабету) та дослідження механізму трансдукції сигналів через глікопротеїнові рецептори із залученням PI-3'-кінази.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження слугували поліморфноядерні та мононуклеарні лейкоцити з периферичної крові здорових донорів і людей, хворих на ЦД 1 типу. Для індукції агрегації лейкоцитів використовували лектини WGA, SNA („Лектино-тест”, Україна), MAA („Sigma”, США):

- WGA – лектин зародків пшениці (специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну- β ,DglcNAc і N-ацетилнейрамінової кислоти-NeuNAc);
- MAA – лектин акації амурської (афінний до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому дисахаридних фрагментів, зв'язаних (α 2 \rightarrow 6) глікозидним зв'язком);
- SNA – лектин бузини чорної (специфічний до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc послідовності в олігосахаридах).

Забір крові проводили з вени у стерильні силіконізовані пробірки. Процесові згортання запобігали, попередньо додавши в посуд гепарин (кінцеве розведення 1:100) у співвідношенні 1:10 (гепарин : цільна кров). Нейтрофільні гранулоцити та мононуклеарні лейкоцити виділяли у градієнті густини (1,115 \pm 0,002 г/см³ при 20°C) Gradisol-G („Aqua-medica”, Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР, рН 7,2). Гемоліз залишкових еритроцитів у нейтрофільних гранулоцитах здійснювали з 0,83% розчином хлористого амонію у дистильованій воді. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не менше 98%.

Отримання лізатів лейкоцитів. Усі операції із виділення цитозольної фракції та фракції плазматичних мембран проводили за +4°C. Зразки ресуспендували у гіпотонічному буфері такого складу: 10 мМ Tris-HCl, рН 7,5; 1,5 мМ MgCl₂, 5 мМ Етилендіамін-тетраоцтової кислоти динатрієва сіль (ЕДТА), 1 мМ фенілметил-

сульфонілхлорид („Sigma”, США), 5 мМ бензамідин („Sigma”), 10 мкг/мл апротиніну („Sigma”), 10 мкг/мл лейпептину („Sigma”), 2 мкг/мл пепстатину („Sigma”), 0,25 мМ Na_3VO_4 . Гомогенізували за допомогою скляних паличок із округлим дном. Лізис лейкоцитів проводили протягом 30 хв на льодяній бані у співвідношенні 100–200 мкл буферу на 10×10^6 клітин. Після центрифугування за 20 000 г упродовж 10 хв (+4°C) відбирали цитозольну фракцію лейкоцитів, яку використовували у подальшому для імуно-блот-аналізу. Осад ресуспендували у гіпотонічному буфері 10 мМ Трис-(оксиметил)-амінометан (Трис-НCl), рН 7,5 та додавали необхідний об’єм 2 М сахарози для досягнення кінцевої концентрації 0,25 М. Після центрифугування при 2 000 г упродовж 20 хв і +4°C відбирали супернатант і додавали 1/3 за об’ємом гіпотонічного буферу. Осад фракції плазматичних мембран отримували центрифугуванням при 20 000 г протягом 90 хв за 4°C і ресуспендували у мінімальній кількості 10 мМ Трис-НCl буферу, рН 7,5. Вихід отриманої мембранної фракції оцінювали за концентрацією білка за Петерсоном.

Для проведення електрофоретичного розділення зразки лізатів лейкоцитів, вирівняні за концентрацією білка, прогрівали при +95°C протягом 5 хв у буфері Леммлі (62,5 мМ трис-НCl (рН 6,8), 1 мМ ЕДТА, 2% додецилсульфат натрію (ДСН), 5% β -меркаптоетанол, 10% гліцерол, 0,4% бромфеноловий синій) [11].

Дослідження агрегаційної здатності нейтрофільних гранулоцитів (НГ) і мононуклеарних (МН) лейкоцитів. Агрегацію НГ і МН визначали стандартним турбідиметричним методом за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації „230 LA Биола” („НПФ Биола”, Росія) в суспензії відмитих нейтрофілів чи мононуклеарів у концентрації $2,5 \times 10^6$ клітин в 1 мл при +37°C і перемішуванні зі швидкістю 800 об/хв за зміною світлопропускання. При дослідженні агрегації до 300 мкл суспензії НГ (або МН) після термостатування протягом 1 хв при +37°C додавали 10 мкл лектину в концентрації 32 мкг/мл. Процес агрегації реєстрували протягом 12–15 хв за зміною показника світлопропускання клітинної суспензії. Показники агрегації визначали за агрегаційною кривою. Ступінь агрегації – максимальний приріст світлопропускання після додавання індуктора виражали у відсотках.

Для дослідження ролі PI-3'-кінази у агрегаційній здатності лейкоцитів, перед лектиніндукованою агрегацією проводили інкубацію суспензії поліморфноядерних та мононуклеарних лейкоцитів зі селективним неконкурентним інгібітором ферменту PI-3'-кінази вортманіном при +37°C протягом 10 хв (кінцева концентрація вортманіну в суспензії клітин 100 нМ). Після завершення інкубації суспензії поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитів центрифугували при 1 500 об/хв протягом 5 хв. Забирали надосадову рідину, в якій містився вортманін. Осади клітин ресуспендували розчином Хенкса („Sigma”).

Електрофорез білків у поліакриламідному гелі (ПААГ). Білки розділяли електрофоретично у блоках 10% поліакриламідного гелю в присутності додецилсульфату натрію в буферній системі Леммлі. Для приготування гелю використовували такі реактиви:

1. Розчин мономерів „АА”: 30% акриламід /0,8% метиленбісакриламід.
2. Буфер „А” для розділяючого гелю: 375 мМ трис-НCl (рН 8,8); 0,4% тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД).

3. Буфер „Б” для концентруючого гелю: 125 мМ трис-НСІ (рН 6,8), 0,5% ТЕМЕД.
4. Електродний буфер 25 мМ трис-НСІ (рН 8,3), 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН.
5. 10% амоній персульфат (ПСА).

Після полімеризації гелю воду відсмоктували, між пластинками вставляли тефлоновий гребінчик і заливали концентруючий гель. У „кишені”, що утворилися після полімеризації концентруючого гелю, вносили необхідну кількість білкового препарату (максимально 80 мкг на трек). Електрофорез проводили при силі струму 20 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт на пластинку протягом 4 год. Для визначення молекулярної маси білків, розділених методом електрофорезу, використовували білкові стандарти фірм „Fermentas”.

Імуноблотинг білків. В основу методу покладено перенос білків з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля з подальшою обробкою отриманих блотів антитілами. Перенос проводять протягом 2 год при силі струму 250 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт у буфері, що містить: 25 мМ трис-НСІ, рН 8,3, 20% метанол, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН. Вільні центри зв'язування на мембрані блокують протягом 1 год 2% бичачий сироватковий альбумін БСА („Sigma”, США) в забуференому фізіологічному розчині (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, рН 7,3) з 0,05% твін-20. Відповідно до поставленої мети мембрану інкубують з першими антитілами (моноклональні антитіла до р85α („Millipore”), р110δ („Upstate”), CD45 („Upstate”)) у блокуючому буфері протягом 2 год з подальшим промиванням блокуючим буфером (5 разів по 3 хв). Як другі антитіла використовували антимишачі IgG („Millipore”), кон'юговані з пероксидазою хрому, в розведенні 1 : 5 000 у блокуючому буфері. Вирівнювання за білком у досліджуваних зразках проводили за інтенсивністю сигналу імунореактивних смуг, які виявлялися при застосуванні моноклональних анти-β-актин антитіл („Sigma”). Інкубацію з другими антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали ЗФР / 0,1% твін-20 (5 разів по 3 хв). Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору для посиленої хемілюмінесценції („Amersham”, Великобританія). Час експозиції оброблених мембран на рентгєнівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 10–20 хв. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень WGA-індукованої агрегації нейтрофілів за даної патології зростає (рис. 1), що може свідчити про підвищення рівня експонування на поверхні клітин глікокон'югатів, комплементарних до цього лектину. Є літературні дані про те, що WGA може інгібувати хемотаксис лейкоцитів у відповідь на дію fMLP (форміл-мет-лей-фен) [4, 17]. Це свідчить про значну роль WGA-комплементарних рецепторів у забезпеченні певного рівня функціонального стану поліморфноядерних лейкоцитів, а збільшення кількості таких рецепторів при ЦД вказує на преактивований стан нейтрофільних гранулоцитів.

SNA-індукована агрегація нейтрофільних гранулоцитів характеризувалася вищими значеннями ступеня агрегації у людей, хворих на ЦД 1 типу, ніж у здорових донорів (рис. 1).

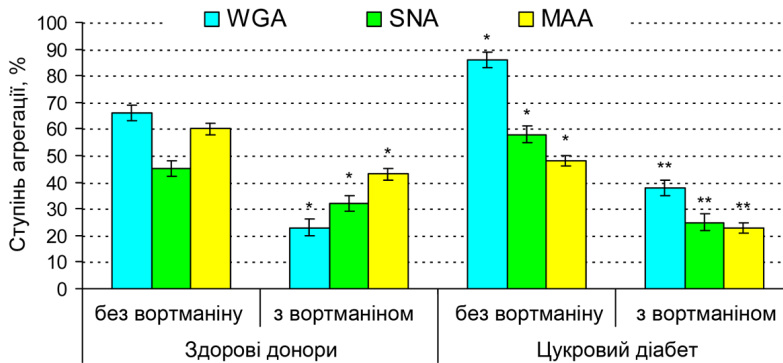


Рис. 1. Вплив вортманіну на показники лектиніндукованої агрегації поліморфноядерних лейкоцитів у здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1 типу.

Тут і далі достовірність відмінностей порівняно з показниками:

* – $p < 0,05$ у контролі; ** – $p < 0,05$ при діабеті

Fig. 1. Wortmannin effect on lectin-induced aggregation of polymorphonuclear leukocytes of healthy donors and patients with type 1 diabetes.

Here and further the reliability of differences compared with the figures:

* – $p < 0.05$ in the control ** – $p < 0.05$ type 1 diabetes

При використанні лектину МАА спостерігали зниження агрегаційної здатності нейтрофільних гранулоцитів із крові хворих на ЦД 1 типу, що супроводжувалося зменшенням ступеня та швидкості агрегації цих клітин (рис. 1). Це, імовірно, є наслідком того, що при ЦД 1 типу у структурі глікопротеїнових рецепторів мембран нейтрофілів зменшується кількість сіалових кислот, зв'язаних ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-глікозидним зв'язком, що впливає на показники процесу МАА-індукованої агрегації нейтрофільних гранулоцитів.

Використані нами три різні сіалоспецифічні лектини дали змогу провести загальне визначення сіалованих глікокон'югатів (при використанні WGA) та диференціювати різні типи зв'язків сіалових кислот зі субтермінальними вуглеводами: SNA – зв'язки $\alpha(2 \rightarrow 6)$, а МАА – зв'язки ($\alpha 2 \rightarrow 3$).

Вивчення агрегації мононуклеарних лейкоцитів є надзвичайно актуальним, тому що ці клітини реалізують основні імунні функції в організмі, а стан їхнього рецепторного апарату залежить від ступеня їхньої зрілості та може виступати маркером вторинного імунодефіцитного стану організму, характерного для людей, хворих на ЦД 1 типу. За умов діабету показники агрегації мононуклеарних лейкоцитів при використанні як індукторів агрегації лектинів WGA і SNA не зазнають достовірних змін порівняно з показниками у здорових донорів (рис. 2). Досліджувана патологія супроводжується зменшенням на поверхні цих клітин сайтів зв'язування для лектину МАА, на що вказують знижені показники ступеня агрегації цих клітин (рис. 2).

Водночас було вивчено вплив селективного неконкурентного інгібітора PI-3'-кінази – вортманіну, на агрегаційну здатність поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитів, стимульовану сіалоспецифічними лектинами зародків пшениці, бузини чорної і акації амурської.

У всіх досліджуваних зразках спостерігалася схожа тенденція, а саме зниження агрегаційної здатності лейкоцитів після дії вортманіну на ці клітини (рис. 1, 2).

Лейкоцити периферичної крові, попередньо оброблені вортманіном, втрачали здатність до агрегації у присутності сіалоспецифічних лектинів значно сильніше при діабеті, ніж у контрольних донорів. Зниження агрегаційної здатності нейтрофільних гранулоцитів та мононуклеарних лейкоцитів при використанні як індукторів агрегації лектинів за підібраних оптимальних умов інкубації клітин з вортманіном можна пояснити активною участю PI-3'-кінази у перегрупованні рецепторного апарату на поверхні клітин крові та у реалізації міжклітинних взаємодій при досліджуваній патології за участю сіаловмісних глікопротеїнів мембран лейкоцитів.

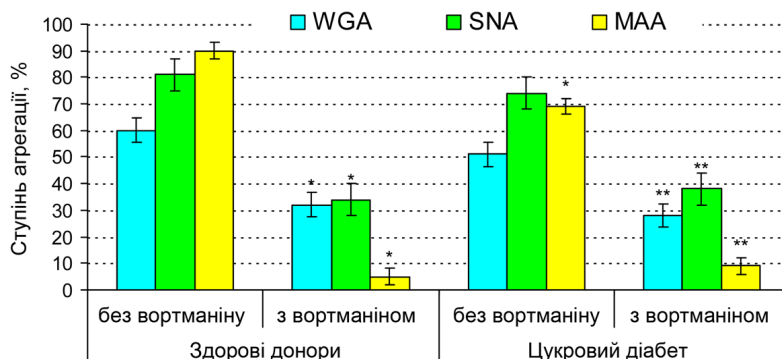


Рис. 2. Вплив вортманіну на показники лектиніндукованої агрегації мононуклеарних лейкоцитів у здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1 типу

Fig. 2. Wortmannin effect on lectin-induced aggregation of mononuclear leukocyte of healthy donors and patients with type 1 diabetes

Водночас важливим було вивчити перерозподіл регуляторної та каталітичної субодиниць PI-3'-кінази між мембранною і цитозольною фракціями в лейкоцитах за умов ЦД 1 типу, оскільки PI-3'-кіназа є одним із найважливіших регуляторних ензимів, який міститься на перехресті найрізноманітніших шляхів сигналювання і контролює ключові функції клітини.

У результаті проведених досліджень шляхом вестерн-блот-аналізу виявлено імунореактивні смуги у мембранній та цитозольній фракціях поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитів як у контрольних зразках, так і за умов ЦД 1 типу.

У поліморфноядерних лейкоцитах здорових людей регуляторна субодиниця PI-3'-кінази – p85 α детектувалася з розподілом між цитоплазматичною та мембранною фракцією як 20% до 80% (рис. 3). За умов ЦД відбувається преактивація нейтрофільних гранулоцитів, що виражається у передчасній дегрануляції цих клітин [6]. Ступінь преактивованості можна підтвердити тотальною транслокацією регуляторної субодиниці p85 α PI-3'-кінази із мембранної фракції у цитозольну, вміст якої досягає 95%, що у 4,5 рази більше, ніж у нормі (рис. 3). У поліморфноядерних нейтрофілах PI-3'-кіназа частково локалізується в цитоплазматичних ліпідних тільцях [9]. Дані дослідження вказують на те, що в лейкоцитах PI-3'-кіназа бере участь у проведенні клітинної відповіді з доменів ліпідних тілець.

У мононуклеарних лейкоцитах контрольних зразків рівень p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази переважав у мембранній фракції (70%) порівняно

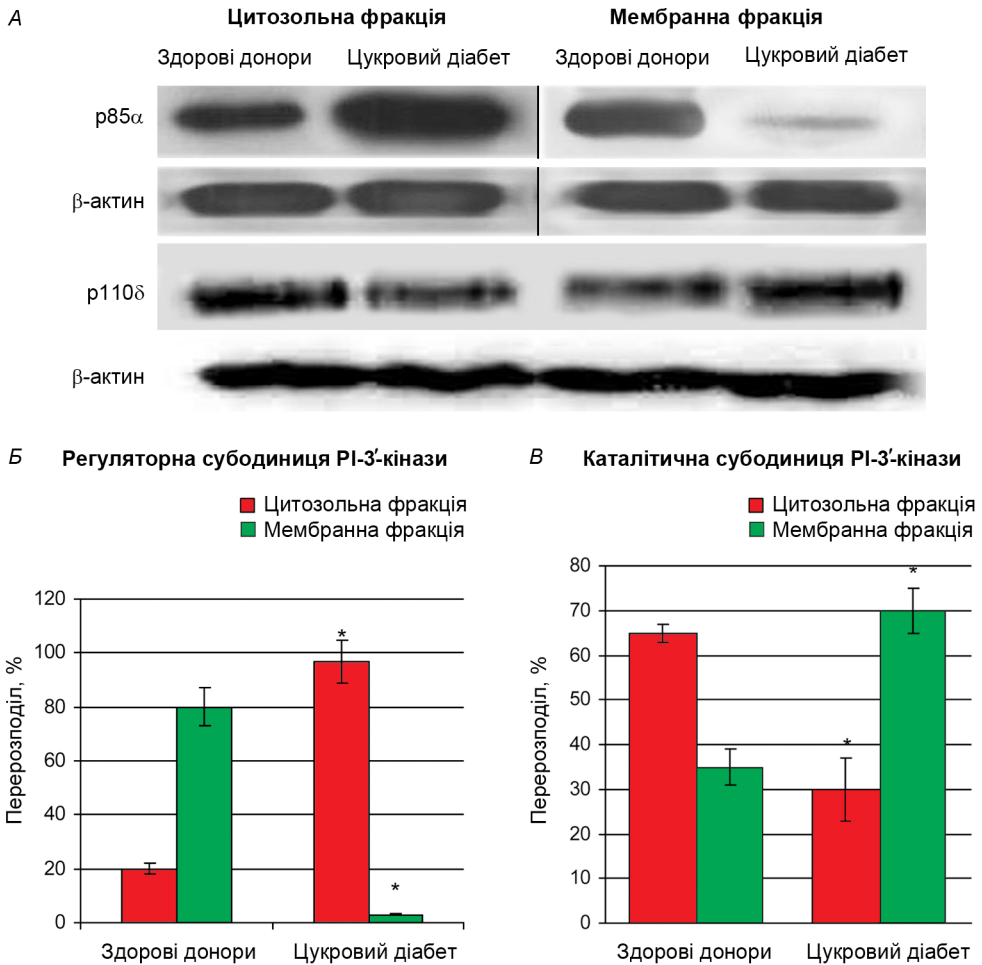


Рис. 3. Імуно-блот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції поліморфноядерних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до p85 α регуляторної субодиноці та до p110 δ каталітичної субодиноці PI-3'-кінази (A) та рівень перерозподілу (за вмістом, %) p85 α регуляторної субодиноці (Б) і p110 δ каталітичної субодиноці (В) PI-3'-кінази

Fig. 3. The immunoblot analysis of proteins in the cytosolic and membrane fractions of polymorphonuclear leukocytes of healthy donors and patients with type 1 diabetes mellitus, using anti-p85 α regulatory subunit and anti-p110 δ catalytic subunit PI-3'-kinase antibodies (A), and the level of p85 α regulatory subunit (B) and p110 δ catalytic subunit (B) PI-3'-kinase redistribution (the content is expressed in percentage terms)

з цитозольною фракцією (30%) (рис. 4). За умов ЦД 1 типу в мононуклеарних лейкоцитах рівень p85 α регуляторної субодиноці PI-3'-кінази також переважав у мембранній (60 %) фракції порівняно з цитозольною (40%) фракцією (рис. 4).

Досліджено перерозподіл p110 δ каталітичної субодиноці PI-3'-кінази у мембранній (30%) та цитозольній (70%) фракціях лізатів мононуклеарних лейкоцитів у здорових донорів (рис. 4). За умов ЦД 1 типу показано зміни у перерозподілі каталітичної субодиноці PI-3'-кінази: 75% у мембранній та 25% у цитозольній

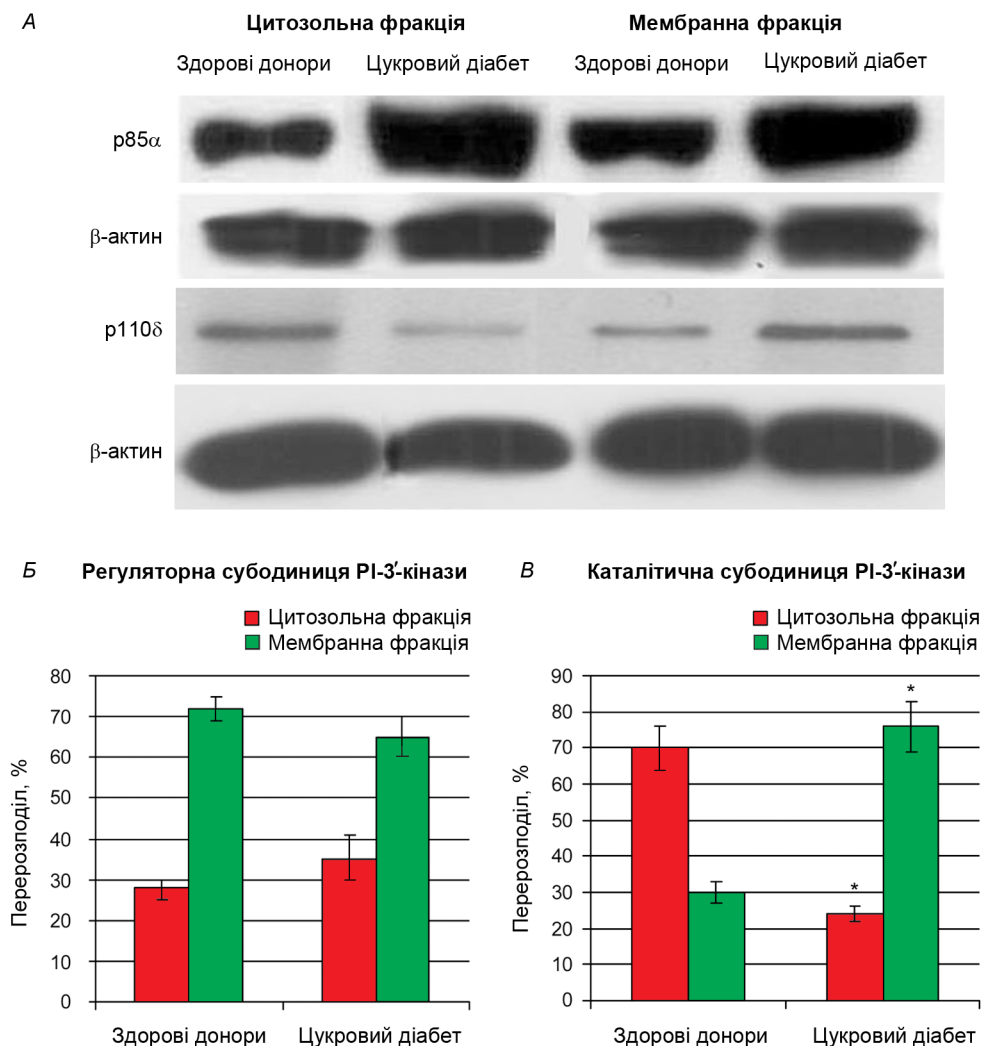


Рис. 4. Імуно-блот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів та людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до p85 α регуляторної субодиниці та до p110 δ каталітичної субодиниці PI-3'-кінази (А) та рівень перерозподілу (за вмістом, %) p85 α регуляторної субодиниці (Б) і p110 δ каталітичної субодиниці (В) PI-3'-кінази

Fig. 4. The immunoblot analysis of proteins in the cytosolic and membrane fractions of mononuclear leukocytes of healthy donors and patients with type 1 diabetes mellitus, using anti-p85 α regulatory subunit and anti-p110 δ catalytic subunit PI-3'-kinase antibodies (A), and the level of p85 α regulatory subunit (B) and p110 δ catalytic subunit (B) PI-3'-kinase redistribution (the content is expressed in percentage terms)

фракціях (рис. 4). Таким чином, на відміну від здорових донорів у мононуклеарних лейкоцитах людей, хворих на ЦД 1 типу, p85 α регуляторна субодиниця та p110 δ каталітична субодиниця PI-3'-кінази були локалізовані в основному в мембранній фракції.

Однакова динаміка перерозподілу і каталітичної, і регуляторної субодиниць досліджуваного ензиму в мембранній фракції мононуклеарів периферичної крові вказує на те, що за умов цукрового діабету PI-3'-кіназа перебуває в активному стані, фосфорилує фосфатидилінозитолі, які беруть участь у проведенні внутрішньоклітинного сигналу. За таких умов у клітинах крові мононуклеарного ряду можуть формуватися стресові фібрили, утворюватись ламелоподії та філоподії, реорганізуватись актиновий цитоскелет, змінюючи морфологічний стан клітини і її рухову здатність. Довготривале перебування клітин у такому субактивованому стані призводить до виснаження мононуклеарних лейкоцитів, що проявляється у порушенні імунного захисту організму людей, хворих на діабет.

Лектини SNA та MAA взаємодіють із CD45⁺ лейкоцитами. CD45 є трансмембранним глікопротеїном, цитоплазматичний домен якого має фосфотирозинфосфатазну активність. Він виявляється на Т, В, НК клітинах, гранулоцитах, моноцитах, тому його ще називають LCA (leukocyte common antigen). Містяться у мембранах лейкоцитів, CD45 асоційований з CD22, з молекулами адгезії та високоафінними рецепторами для IgE, що безпосередньо дає йому змогу брати участь у процесах клітинної адгезії. Відомо про колокалізацію CD45 рецептора, що містить $\alpha(2\rightarrow3)$ -приєднані сіалові кислоти, з рецептором CD3 лейкоцитів.

У результаті наших досліджень було виявлено значне зростання рівня поверхневого антигену CD45 в нейтрофільних гранулоцитах і менш яскраво виражене зростання рівня CD45 у мононуклеарних лейкоцитах хворих на ЦД 1 типу (рис. 5). Це може бути наслідком преактивації лейкоцитів у зв'язку зі структурно-функціональними змінами рецепторного апарату в цілому за умов досліджуваної патології. Зростання рівня CD45 у лейкоцитах за умов патології може бути цікавим з огляду на таке: оскільки CD45 є антагоністом тирозинової кінази рецептора до інсуліну, то він може проявляти високу активність до мембранозв'язаних молекул (рецепторів до інсуліну, епідермального ростового фактора). Для проведення сигналу від інсуліну повинні автофосфорилуватись внутрішньоцитозольні сайти по тирозину. CD45 може дефосфорилувати місця аутофосфорилування – субодиниці інсулінового рецептора (1150–1151), чим пригнічує передачу сигналу. Тобто він є антагоністом тирозинових кіназ і рецепторів до інсуліну.

ВИСНОВКИ

1. Ступінь лектиніндукованої агрегації лейкоцитів крові може слугувати одним із порівняльних параметрів імунореактивності цих клітин в організмі здорових і хворих на ЦД 1 типу донорів.
2. Інгібуючий ефект вортманіну щодо лектиніндукованої агрегації лейкоцитів свідчить про те, що фермент PI-3'-кіназа залучений у шлях трансдукції клітинного сигналу, який вноситься сіалоспецифічними лектинами до глікопротеїнових рецепторів мононуклеарних та сегментоядерних лейкоцитів.
3. Вестерн-блот-аналізом показано перерозподіл локалізації p85 α регуляторної субодиниці та p110 δ каталітичної субодиниці PI-3'-кінази у мембранній та цитозольній фракціях лейкоцитів за умов ЦД 1 типу. Ці зміни корелюють зі змінами в агрегаційній активності цих клітин, які опосеред-

4. *Chang Y., Chan Y., Jackson D.* et al. The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion. **J. Immunol**, 2006; 176(1): 173–180.
5. *Clevers H., Dunlap S., Terhorst C.* The transmembrane orientation of the ϵ chain of the TcR/CD3 complex. **European J. of Immunology**, 2005; 18(5): 705–710.
6. *Dodd R.B., Drickamer K.* Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, 2001; 11: 71R–79R.
7. *Frampton M., Stewart J., Oberdorster G.* et al. Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. **Environ. Health. Perspect**, 2006; 114: 51–58.
8. *Harduin-Lepers A., Mollicone R., Delannoy P., Oriol R.* The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: A phylogenetic approach. **Glycobiology**, 2005; 15: 805–817.
9. *Kapeller R., Chakrabarti R., Cantley L.* et al. Internalization of activated platelet-derived growth factor receptor-phosphatidylinositol-3'-kinase complexes: potential interactions with the microtubule cytoskeleton. **Mol. Cell Biol**, 1993; 13: 6052–6063.
10. *Kopff M., Zakrzewska I., Klem I.* **Acta Biochimica Polonica**, 1997; 44(2): 359–362.
11. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680–5.
12. *Nakata N., Furukawa K., Greenwalt D.* et al. Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Ac alpha 2→6GalNAc beta 1→4GlcNAc and the Man alpha 1→2Man alpha 1→3Man alpha 1→6Man groups. **Biochemistry**, 1993; 32(16): 4369–83.
13. *Okada T., Sakuma L., Fukui Y.* et al. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol-3'-kinase. **J. Biol. Chem**, 1994; 269: 3563–3567.
14. *Ptasznik A., Prossnitz E.R., Yoshikawa D.* et al. A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate formation in chemoattractant-stimulated human neutrophils. **J. Biol. Chem**, 1996; 271: 25, 204–25, 207.
15. *Rudiger H., Gabius H.J.* Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj. J**, 2001; 18: 589–613.
16. *Schauer R.* Sialic acids: Fascinating sugars in higher animals and man. **Zoology**, 2004; 107: 49–64.
17. *Sharon N., Lis H.* History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, 2004; 14: 53R–62R.
18. *Soudais C., de Villartay J.P., Le Deist F.* et al. Independent mutations of the human CD3- ϵ gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. **Nat. Genet**, 1993; 3: 77–81.
19. *Stephens L., Jackson T., Hawkins P.T.* Synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in permeabilized neutrophils regulated by receptors and G-proteins. **J. Biol. Chem**, 1993; 268: 17, 162–17, 172.
20. *Sybirna N. A., Barska M. L.* Neutrophils functional state under insulin-dependent diabetes mellitus. **Laboratory Diagnostics**, 2003; 2: 33–37 (In Ukrainian).
21. *Tavares S., Stopa E., Robbins S.* Differential Distribution of the JC Virus Receptor-Type Sialic Acid in Normal Human Tissues. **Am. J. Pathol**, 2004; 164: 419–28.
22. *Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N.* Induced aggregation of cells. **Ukr. Biochem. J**, 1991; 63(6): 3–14 (in Russian).
23. *Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N.* H₂O₂ generation and human neutrophil aggregation as affected by lectins. **Gematol. Transfuziol**, 1995; 40(4): 32–5.
24. *Traynor-Kaplan A.E., Thompson B.L., Harris A.L.* et al. Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. **J. Biol. Chem**, 1989; 264: 15, 668–15, 673.
25. *Varki A.* Glycan-based interactions involving vertebrate sialic acid-recognizing proteins. **Nature**, 2007; 446: 1023–1029.

26. *Vlahos C.J., Matter W.F.* Signal transduction in neutrophil activation: phosphatidylinositol-3'-kinase is stimulated without tyrosine phosphorylation. **FEBS Lett**, 1992; 309: 242–248.
27. *Wengui Yu., Jessica Cassara, Peter F. Weller.* Phosphatidylinositol-3'-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. **Blood**, 2000, 95(3): 1078–1085.
28. *Сибірна Н.О., Барська М.Л., Лаповець Л.Є.* Деякі показники клітинного та гуморального імунітету у хворих на цукровий діабет 1-го типу. **Лабораторна діагностика**, 2003; 4: 47–50.

PARTICIPATION OF PI-3'-KINASE SIGNALING PATHWAY IN DETERMINING STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF LEUKOCYTE MEMBRANES UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

M. Zdioruk, I. Brodyak, N. Sybirna

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: n_zdioruk@hotmail.com*

Leukocytes aggregation ability from blood of healthy donors and type 1 diabetes mellitus patients and molecular mechanisms of signal transduction through glycoprotein receptors involving phosphatidylinositol-3'-kinase, which influence polymerization of actin cytoskeleton of the studied cells were studied. This is a key problem in ensuring the leukocytes migration ability.

Key words: neutrophilic granulocytes, mononuclear leukocytes, lectin-induced aggregation, phosphatidylinositol-3'-kinase.

УЧАСТИЕ PI-3'-КИНАЗНОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Н. И. Здиорук, И. В. Бродяк, Н. А. Сибирная

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: n_zdioruk@hotmail.com*

Исследована агрегационная способность лейкоцитов крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом 1 типа, а также молекулярные механизмы трансдукции сигналов через гликопротеиновые рецепторы при участии фосфатидилинозитол-3'-киназы, которая играет важную роль в осуществлении влияния на полимеризацию актинового цитоскелета исследуемых клеток, что является ключевым моментом в обеспечении миграционной способности лейкоцитов.

Ключевые слова: мононуклеарные лейкоциты, нейтрофильные гранулоциты, лектининдуцированная агрегация, фосфатидилинозитол-3'-киназа, сахарный диабет 1 типа.

Одержано: 07.04.2011