



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

ВПЛИВ ВОРТМАНІНУ НА АГРЕГАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

**М. І. Здіорук¹, М. Л. Барська², І. В. Бродяк¹,
О. І. Вовк², А. М. Урбанович³, Н. О. Сибірня¹**

*¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail n_zdioruk@hotmail.com*

²Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

*³Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна*

Проведено визначення впливу вортманіну на агрегаційну здатність нейтрофілів, стимульовану сіалоспецифічними лектинами WGA, SNA і MAA. Зміни функціонального стану лейкоцитів за умов цукрового діабету 1-го типу зумовлені збільшенням кількості сіаловмісних глікопротеїнових рецепторів плазматичних мембран, що у своїй структурі містять дисахарид NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DgalNAc, а не NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc. Підвищена здатність нейтрофільних гранулоцитів до агрегації під впливом сіалоспецифічних лектинів за умов цукрового діабету, з одного боку, і слабка відповідь на інгібуючу дію вортманіну, з іншого боку, можуть бути тестами для виявлення порушень у морфофункціональному стані лейкоцитів, який зумовлює зміни реологічних властивостей крові та провокує розвиток ангіопатій при досліджуваній патології.

Ключові слова: нейтрофільні гранулоцити, сіаловмісні глікопротеїни, лектин-індукована агрегація, цукровий діабет 1-го типу.

ВСТУП

Поверхневі лейкоцитарні глікопротеїни відіграють вирішальну роль у патогенезі ангіопатій за цукрового діабету (ЦД) 1-го типу, оскільки вони залучені до молекулярних клітинних механізмів, які відповідають за агрегацію і адгезію клітин крові. Агрегація клітин – це комплексний феномен, для реалізації якого необхідна ціла низка умов. Серед цих умов поряд із присутністю двовалентних катіонів, наявністю певних елементів цитоскелету і певної величини електростатичного заряду важливу роль відіграють поверхневі клітинні рецептори, які сприймають позаклітинний стимул. Здатність до агрегації нейтрофільних гранулоцитів (НГ) під впливом лектинів може бути

використана як модель передміграційної відповіді лейкоцитів на хемоатрактантний фактор, що забезпечує механізми хемотаксису для збільшення кількості нейтрофілів у місцях запалення [4]. У такий спосіб відбувається акумуляція агрегатів нейтрофілів у мікросудинах і, в разі порушення дезагрегаційних механізмів, може відбуватись ушкодження судин продуктами метаболізму активованих НГ. Активация НГ безпосередньо пов'язана із рецепторним апаратом плазматичної мембрани. Інтерналізація, експресія або маскування тих чи інших рецепторів істотно впливає на функціональну активність даних клітин [8, 9].

Фосфатидилінозитол-3'-кіназа (PI-3'-кіназа) є одним з найважливіших регуляторних ферментів, що перебуває на перехресті різних сигнальних шляхів і контролює ключові функції клітини. Цей ензим, взаємодіючи з інтегриновими рецепторами, бере участь в проведенні сигналу як у клітині, так і в міжклітинному просторі. При активації PI-3'-кіназного сигнального шляху змінюється рецепторний апарат клітин та їхні адгезивні властивості. За умов ЦД 1-го типу відбувається перерозподіл вуглеводних детермінант у структурі глікокон'югатів мембран лейкоцитів периферичної крові, що, у свою чергу, призводить до модифікації міжклітинного впізнавання, порушення імунної відповіді, агрегаційної і адгезивної здатності цих клітин. Дослідження впливу селективного неконкурентного інгібітора PI-3'-кінази – вортманіну – на агрегаційну здатність НГ дає змогу з'ясувати роль PI-3'-кінази в організації міжклітинних молекулярних взаємодій і дослідити характер цих взаємодій за умов ЦД 1-го типу.

Метою даної роботи було з'ясувати вплив вортманіну на функціональні особливості НГ за умов ЦД 1-го типу шляхом дослідження лектиніндукованої агрегації цих клітин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження слугували НГ з периферичної крові здорових донорів та людей, хворих на ЦД 1-го типу. Для ідукції агрегації нейтрофілів використовували лектини **WGA** („Лектинотест”, Україна), **MAA**, **SNA** („Sigma”, США):

- **WGA** – лектин зародків пшениці (специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну (β ,DgIcNAc) і N-ацетилнейрамінової (**NeuNAc**) (сіалової) кислоти);
- **MAA** – лектин акації амурської (афінний до послідовності N-ацетил-нейрамінова кислота-(α 2 \rightarrow 3)-D-галактоза/N-ацетил-D-галактоза (**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).

НГ виділяли з венозної гепаринізованої крові (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100) у градієнті густини з використанням Gradisol-G („Aqua-medica”, Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином (рН 7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98%.

Після відмивання НГ від залишків Gradisol-G клітини підраховували в камері Горяєва та готували робочу суспензію нейтрофілів у концентрації $2,5 \times 10^6$ клітин в 1 мл. Проводили інкубацію робочої суспензії з вортманіном (W) при +37°C протягом 10 хв (кінцева концентрація вортманіну в суспензії клітин становила 100 нМ).

Агрегацію НГ визначали стандартним турбідиметричним методом за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації „230 LA Биола” („НПФ Биола”, Росія) в суспензії відмитих нейтрофілів у концентрації $2,5 \times 10^6$ клітин в 1 мл при $+37^\circ\text{C}$ і перемішуванні зі швидкістю 800 об/хв за зміною світлопропускання. При дослідженні агрегації до 300 мкл суспензії НГ після термостатування протягом 1 хв при $+37^\circ\text{C}$ 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. Швидкість агрегації – максимальний нахил кривої світлопропускання після додавання індуктора – виражали у відсотках за 1 хв [6, 7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Найвиразніша динаміка змін у бік збільшення показників лектиніндукованої агрегації за ЦД 1-го типу спостерігалася при використанні лектину WGA (табл., рис. 1). За умови патології максимальний ступінь агрегації перевищує аналогічний показник у контролі на 21%, що може свідчити про підвищення рівня експресії на поверхні клітин комплементарних цьому лектинові глікокон'югатів. До WGA-зв'язуючих глікопротеїнів належать рецептор до N-форміл-метіоніл-лейцил-фенілаланіну (fMLP), C_{5a} -компонент системи комплемента, ІЛ-8, рецептор гранулоцитарно-моноцитарного колонієстимулювального фактора (GM-CSF-рецептор), клітинний рецептор 3 (Mac-1). Саме через рецептор Mac-1 відбувається взаємодія НГ з молекулою міжклітинної адгезії 1 (ICAM-1, CD 54), яка бере участь в адгезії лейкоцитів до ендотелію судин у стані запалення. З іншого боку, відомо, що через WGA-специфічні рецептори відбувається стимуляція респіраторного вибуху в НГ шляхом активації NADPH-оксидази з подальшим утворенням активних форм кисню [3].

Показники лектиніндукованої агрегації нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу
Lectin-induced aggregation of neutrophilic granulocytes in healthy donors and in the patients with type 1 diabetes mellitus

Показники / Indices			Максимальний ступінь агрегації, % Level of aggregation, %	
			-W	+W
Лектини / Lectins	WGA	К / Control	45±3,3	23±1,2*
		ЦД / Type 1 DM	57±4,5*	38±3,1**
	SNA	К / Control	45±3,2	32±2,8
		ЦД / Type 1 DM	58±3,3*	25±1,1**
	MAA	К / Control	59±4,7	43±3,1
		ЦД / Type 1 DM	41±2,9*	23±1,2**

Примітка. Достовірність відмінностей порівняно з показниками:

* – $p < 0,05$ у контролі (-W); ** – $p < 0,05$ при ЦД (-W)

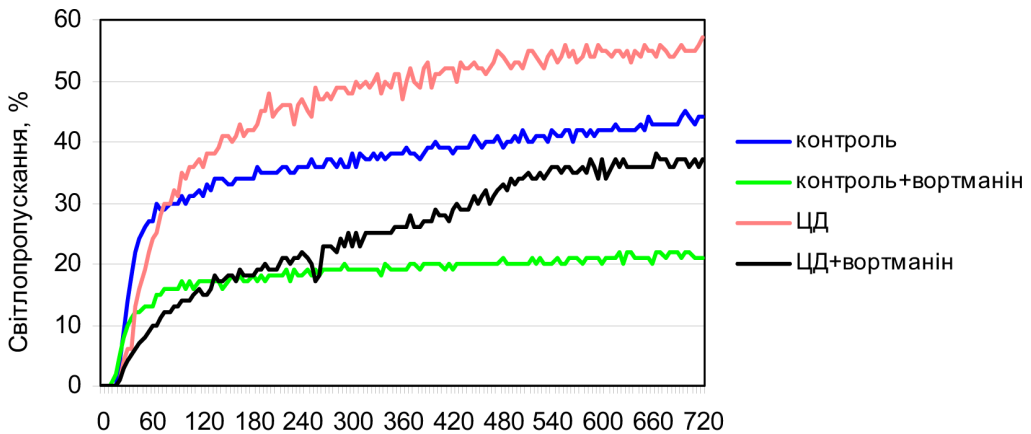


Рис. 1. Типові криві агрегації нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу та криві агрегації преінкубованих клітин з вортманіном тих самих донорів при використанні в обох випадках індуктора агрегації – лектину **WGA**

Fig.1. Typical curves of neutrophilic granulocytes aggregation in healthy donors and in the patients with type 1 diabetes mellitus and type aggregation curves of neutrophilic granulocytes incubated with wortmannin; in both cases **WGA** was used as aggregation inducers

За дії лектину SNA (рис. 2, табл.) показник агрегації лейкоцитів хворих зростає на 20% порівняно з таким у контрольних донорів. Зменшення ступеня агрегації НГ на 27% спостерігали для хворих на ЦД під впливом лектину MAA (рис. 3, табл.). Сильна і швидка агрегація НГ при використанні як індукторів агрегації WGA і SNA є наслідком того, що у структурі глікопротеїнових рецепторів мембрани НГ хворих на ЦД 1-го типу наявні у підвищеній кількості порівняно зі здоровими донорами вуглеводні детермінанти, які у своїй структурі містять переважно NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)-DGal/DgalNAc-, а не NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)-DGal/DgalNAc-дисахаридні фрагменти. Такі особливості термінальних залишків глікокон'югатів плазматичної мембрани НГ за умови патології можуть впливати як на динамічні, так і на кінетичні показники процесу агрегації клітин.

Ступінь інгібування агрегації НГ, стимульованої лектинами WGA, SNA і MAA, після інкубації з селективним інгібітором ферменту PI-3'-кінази вортманіном у контрольних донорів був помітно вищим, ніж за умови патології. Лейкоцити контрольних донорів, попередньо оброблені вортманіном, втрачали здатність до агрегації у присутності всіх застосованих лектинів у середньому на 48%. Преінкубація лейкоцитів хворих на ЦД з вортманіном призводила до менш вираженого зниження показників агрегації нейтрофілів, ніж у здорових донорів у середньому на 28% за дії всіх лектинів (табл., рис. 1–3).

Вортманін інгібує агрегацію нейтрофілів у відповідь на дію fMLP та інших хемоатрактантів у такому ж самому концентраційному діапазоні, який необхідний для інгібування PI-3'-кінази. На противагу цьому, вортманін не має впливу на стимульоване fMLP зростання експресії інтегринів CD11b/CD18 та CD35, маркерів мобілізації секреторних везикул із цитозольних компартментів на цитоплазматичну мембрану нейтрофілів, а також на стимульовану fMLP активність протеїнкінази ERK. Відомо

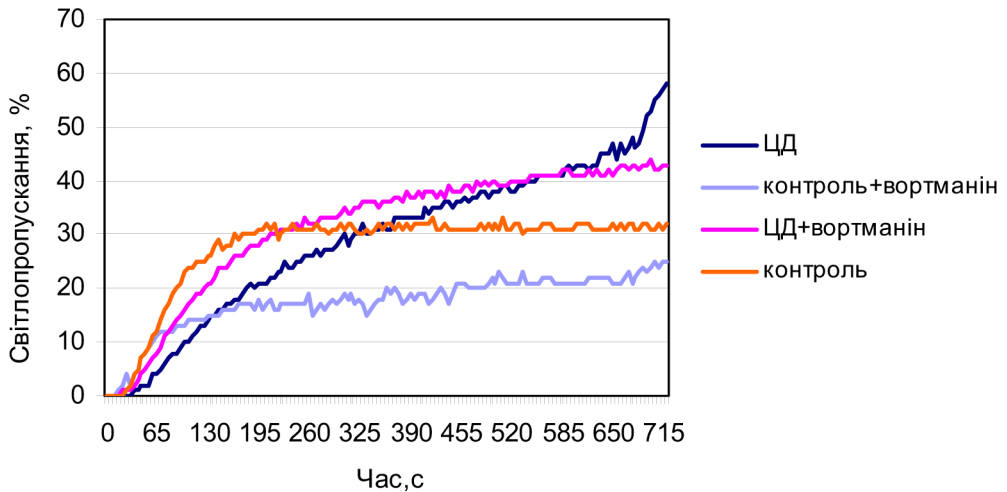


Рис. 2. Типові криві агрегації нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу та криві агрегації преінкубованих клітин з вортманіном тих самих донорів при використанні в обох випадках індуктора агрегації – лектину **SNA**

Fig. 2. Typical curves of neutrophilic granulocytes aggregation in healthy donors and in the patients with type 1 diabetes mellitus and type aggregation curves of neutrophilic granulocytes incubated with wortmannin; in both cases **SNA** was used as aggregation inducers

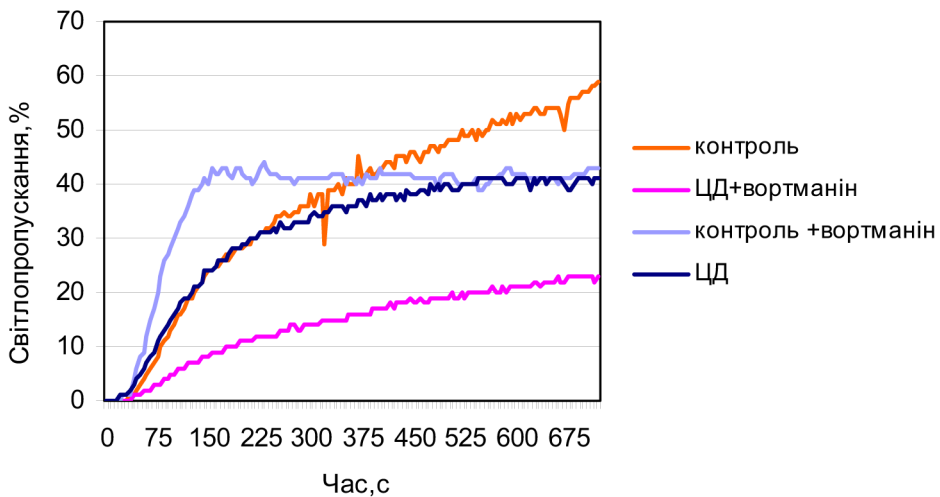


Рис. 3. Типові криві агрегації нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1-го типу та криві агрегації преінкубованих клітин з вортманіном тих самих донорів при використанні в обох випадках індуктора агрегації – лектину **MAA**

Fig. 3. Typical curves of neutrophilic granulocytes aggregation in healthy donors and in the patients with type 1 diabetes mellitus and type aggregation curves of neutrophilic granulocytes incubated with wortmannin; in both cases **MAA** was used as aggregation inducers

про ключову роль PI-3'-кінази у сигнальних шляхах НГ, які забезпечують їхню агрегацію і адгезію [2, 5]. Відомо, що агрегація нейтрофілів може активізуватись під впливом fMLP через відповідні рецептори, що призводить до швидкої полімеризації F-актину. У більшості випадків ініціація полімеризації актину призводить до перебудови цитоскелету клітини [1].

Виявлені нами зміни у динамічних і кінетичних показниках процесу агрегації НГ за умови ЦД 1-го типу можуть свідчити про зміну кількості або перебудови у структурі вуглеводних детермінант сіаловмісних рецепторів, комплементарних до WGA, SNA, MAA. Зменшення ступеня інгібування вортманіном агрегації НГ хворих на ЦД 1-го типу під впливом WGA, SNA і MAA є наслідком перерозподілу вуглеводних компонентів у карбогідратних детермінантах сіалоглікопротеїнів поверхні лейкоцитів, через які здійснюється трансдукція сигналів, які регулюють агрегаційні й адгезивні властивості клітин. Зміни кількості або структури цих вуглеводних детермінантів можуть підвищувати клітинну агрегацію й адгезію та, як наслідок – виступати патогенетичним чинником у порушенні процесів мікроциркуляції крові й розвитку ангіопатій.

ВИСНОВКИ

1. За показниками агрегації НГ у структурі сіалоглікопротеїнових рецепторів мембрани клітин хворих на цукровий діабет 1-го типу виявлено підвищену кількість дисахаридних фрагментів NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DgalNAc та зниження вмісту NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc-дисахаридів.
2. Зниження агрегаційної здатності НГ 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 мембрани лейкоцитів.
3. За умов ЦД 1 типу підвищена здатність НГ до агрегації під впливом сіалоспецифічних лектинів, з одного боку, і слабка відповідь на інгібуючу дію вортманіну при дослідженні агрегації нейтрофілів, з іншого боку, можуть бути тестами для виявлення порушень функціонального стану лейкоцитів за умов досліджуваної патології.

Дослідження були підтримані грантом УНТЦ (Науково-технологічного Центру України), 2008–2010 рр.

1. Arcaro A., Wymann M. P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. **Biochem. J.** 1993; 296: 297–301.
2. Capodici C., Hanft S., Feoktistov M., Pillinger M.H. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway. **J. Immunol.** 1998; 160 (4): 1901–1909.
3. Karlsson A. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. **Infect. Immun.** 1999; 67 (7): 3461–3468.
4. Mease A.D., Burgess D.P., Thomas P.J. Irreversible neutrophil aggregation. A mechanism of decreased newborn neutrophil chemotactic response. **Am. J. Pathol.** 1981; 104: 98–102.

5. Nurun Nabi A.H.M., Islam L.N., Rahman M. M., Biswas K. B. Polymorphonuclear Neutrophil Dysfunctions in Streptozotocin-induced Type 1 Diabetic Rats. **J. Biochem. and Mol. Biol.**, 2005; 38 (6): 661–667.
6. Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N. Induced aggregation of cells. **Ukr. Biochem. J.**, 1991; 63 (6): 3–14.
7. Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N. H₂O₂ generation and human neutrophil aggregation as affected by lectins. **Gematol Transfuziol.**, 1995; 40 (4): 32–5.
8. Walrand S., Guillet C., Boirie Y., Vasson M-P. *In vivo* evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, 2004; 76: 1104–1110.
9. Сибірна Н.О., Барська М.Л. Функціональний стан нейтрофілів при цукровому діабеті 1 типу. **Лабораторна діагностика**, 2003; 2: 33–37.

INFLUENCE OF WORTMANIN ON AGREGATION ABILITY OF NEUTROPHYLIC GRANULOCYTES UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

M. Zdioruk¹, M. Barska², I. Brodyak¹, O. Vovk², A. Urbanovich³, N. Sybirna¹

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

³Danylo Halytsky National Medical University of Lviv, 69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine

The determination wortmannin influence on aggregation ability of neutrophilic granulocytes induced by specific lectins such as WGA, SNA and MAA was conducted. Distinct functional changes of the leucocytes under type 1 diabetes mellitus contingently by quantitative increasing of plasmatic membrane sialic containing glycoprotein receptors which contain in their structure NeuNAc(α2→6)DGal/DgalNAc carbohydrate, but not NeuNAc(α2→3)DGal/DgalNAc carbohydrate were revealed. Enhanced ability of neutrophilic granulocytes aggregation under influence of specific lectins at type 1 diabetes mellitus and weak answer of wortmannin inhibition may used as test system for determination of dearrangements in functional changes of the leukocytes under type 1 diabetes mellitus.

Key words: neutrophilic granulocytes, sialic containing glycoprotein, lectin induced aggregation, type 1 diabetes mellitus.

ВЛИЯНИЕ ВОРТМАНИНА НА АГРЕГАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

**Н. И. Здиорук¹, М. Л. Барская², И. В. Бродяк¹,
Е. И. Вовк², А. М. Урбанович³, Н. А. Сибирная¹**

¹Львовський національний університет імені Івана Франка
ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Україна

²Інститут біології клітки НАН України, ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Україна

³Львовський національний медичинський університет імені Данила Галицького
ул. Пекарська, 69, Львов 79010, Україна

Проведено определение влияния вортманнина на агрегационную способность нейтрофилов, стимулированную сиапоспецифическими лектинами WGA, SNA и MAA.

Изменение функционального состояния лейкоцитов при сахарном диабете 1-го типа обусловлено увеличением количества сиалосодержащих гликопротеиновых рецепторов плазматических мембран, которые в своей структуре содержат дисахарид NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DgalNAc, а не NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal/DgalNAc.

Повышенная способность нейтрофильных гранулоцитов к агрегации под влиянием сиалоспецифических лектинов при сахарном диабете 1-го типа, с одной стороны, и слабый ответ на ингибирующее действие вортманина, с другой стороны, могут быть тестами для определения нарушений в морфофункциональном состоянии лейкоцитов, которое обуславливает нарушения реологических свойств крови и провоцирует развитие ангиопатий при исследуемой патологии.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, сиалосодержащие гликопротеины, лектининдуцированная агрегация, сахарный диабет 1-го типа.

Одержано: 08.09.2009