

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТРАНСДУКЦІЇ ЛЕКТИНІНДУКОВАНОГО СИГНАЛУ У ЛЕЙКОЦИТАХ ЛЮДЕЙ, ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 1 ТИПУ

М. Здіорук, І. Бродяк, Н. Сибірна

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

Визначено вміст p85-альфа регуляторної субодиниці ферменту фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кінази) лейкоцитів здорових донорів і хворих на цукровий діабет 1 типу. З'ясовано, що трансдукція сигналу, викликаного зв'язуванням сіалоспецифічних лектинів із вуглеводними детермінантами глікокон'югатів мембрани лейкоцитів, опосередковується PI-3'-кіназним шляхом. Показано, що за умов цукрового діабету клітинна відповідь, яка реєструвалась як транслокація регуляторної субодиниці ферменту PI-3'-кінази після лектиніндукованого впливу на нейтрофіли й мононуклеари, відрізнялася за своєю інтенсивністю та формуванням у часі для лектинів WGA, SNA і MAA, що може бути пов'язане зі зміною кількості або структури плазматичних глікопротеїнових рецепторів, які містять $\alpha(2\rightarrow3)$ - і $\alpha(2\rightarrow6)$ -приєднані термінальні сіалові кислоти.

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

За умов цукрового діабету відбувається виражений перерозподіл сіаловмісних вуглеводних детермінант у просторовій структурі глікопротеїнових рецепторів мембран лейкоцитів периферичної крові. Це є причиною порушення функціонального стану мононуклеарних та поліморфноядерних лейкоцитів і може призвести до зміни агрегаційної й адгезивної здатності цих клітин 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 [16].

Преактивація лейкоцитів за умов цукрового діабету 1 типу у зв'язку зі структурно-функціональними змінами рецепторного апарату може бути зумовлена зміною рівня експресії p85-альфа регуляторної субодиниці фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кінази), якій, за даними публікацій останніх років, надається важливе значення у формуванні локомоторної функції лейкоцитів при різних патологіях [3]. PI-3'-кіназа, взаємодіючи з інтегровими рецепторами, бере участь у передачі сигналу як усередину клітини, так і назовні, а також у формуванні фокальних контактів на поверхні мембран лейкоцитів. Серед клітинних білків, які є мішенями для PI-3'-кінази, є і низькомолекулярні GTPази, які задіяні у реалізації такої клітинної відповіді на зовнішнє подразнення, як формування стресових фібрил, утворення ламелоподій та філоподій, тобто зміни морфологічного стану клітини і руху. Усе це відбувається у результаті реорганізації актинового цитоскелету клітини [8].

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 інтегрин-залежну фокальну адгезію клітин. Крім того, PI-3'-кіназа може бути залучена до експонування й інтерналізації глікопротеїнів на мембрані нейтрофільних гранулоцитів, а також до вивільнення глікокон'югатів із

внутрішньоклітинних гранул під час збудження нейтрофілів хемоатрактантами різної природи [15].

Для з'ясування механізмів виникнення структурно-метаболических особливостей клітин за умов різних патологій застосовуються лектини, які є групою білків неімуного походження, що володіють загальною властивістю зворотно і вибірково зв'язувати вуглеводи та вуглеводні детермінанти біополімерів без зміни їхньої ковалентної структури [13]. Як молекулярні функціональні зонди лектини дають інформацію про рухливість мембранних рецепторів і їхню взаємодію з ефекторами [5]. Функціональна спеціалізація рецепторів до різних лектинів, ознакою якої є експресія одних, маскування або інтерналізація інших рецепторів при реалізації міжклітинних взаємодій, може змінюватися у процесі розвитку патології [12].

Метою нашої роботи було дослідити динаміку транслокації регуляторної субодиниці р85-альфа/PI-3'-кінази між мембранною та цитозольною фракціями за умов моделювання передміграційного стану білих клітин крові шляхом індукції агрегації лейкоцитів різними сіалоспецифічними лектинами.

Матеріали та методи

Інкубація та лізис клітин. Об'єктом дослідження слугували поліморфноядерні та мононуклеарні лейкоцити з периферичної крові здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу. 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 ($1,115 \pm 0,002 \text{ g/cm}^3$ при 20°C) Gradisol-G ("Aqua-medica", Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника [9]. Після центрифугування клітини двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР, рН 7,2). Гемоліз залишкових еритроцитів у фракції нейтрофільних гранулоцитів здійснювали з використанням 0,83% розчину амоній хлористого, приготованого на дистильованій воді. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не менше 98%.

Для дослідження динаміки транслокації регуляторної субодиниці PI-3'-кінази клітини інкубували з такими лектинами, як WGA, SNA ("Лектинотест", Україна), MAA ("Sigma", США):

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

Інкубація проводилась при 37°C у різних часових інтервалах (0,5 хв, 1 хв, 2 хв, 15 хв), тоді суспензії поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитів центрифугували при 1500 об/хв протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину, а лейкоцити лізували, виділяли мембранну та цитозольну фракцію, проварювали в буфері Леммлі.

Усі операції по виділенню фракції плазматичних мембран проводили за 4°C . Зразки ресуспендували у гіпотонічному буфері такого складу: 10 мМ Tris-HCl, рН 7,5; 1,5 мМ MgCl_2 , 5 мМ EDTA, 5 мМ EGTA, 1 мМ фенілметилсульфонілхлорид ("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 20000 г впродовж 10 хв (4°C) відбирали цитозольну фракцію лейкоцитів, яку використовували у подальшому для імуноблот-аналізу. Осад ресуспендували у гіпотонічному буфері 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5) та додавали необхідний об'єм 2 М сахарози для досягнення кінцевої концентрації 0,25 М. Після центрифугування при 2000 г впродовж 20 хв при 4°C відбирали супернатант і додавали 1/3 за об'ємом гіпотонічного буферу. Осад фракції плазматичних мембран отримували центрифугуванням при 20000 г протягом 90 хв за 4°C і ресуспендували у мінімальній кількості 10 мМ Tris-HCl буферу, pH 7,5. Вихід отриманої мембранної фракції оцінювали за концентрацією білка за Петерсоном.

Електрофорез білків у поліакриламідному гелі (ПААГ). Білки розділяли електрофоретично у блоках 10% поліакриламідного гелю в присутності натрій додецилсульфату в буферній системі Леммлі [10].

Електрофоретичне розділення проводили при силі струму 20 мА, напрузі 200 В і 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 проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА, напрузі 200 В і потужності 50 Вт у буфері, що містить: 25 мМ трис-HCl, pH 8,3; 20% метанол; 192 мМ гліцин; 0,1% SDS. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 2% BSA ("Sigma", США) в ЗФР (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na_2HPO_4 , 1,7 мМ KH_2PO_4 , pH 7,3) з 0,05% твін-20. Відповідно до поставленої мети мембрану інкубують з першими антитілами (моноклональні антитіла до р85-альфа, "Millipore") у блокуючому буфері протягом 2 год з подальшим промиванням блокуючим буфером (5 разів по 3 хв). Як другі антитіла використовували анти-мишачі IgG ("Millipore"), кон'юговані з пероксидазою хрому. Інкубацію з другими антитілами проводили протягом 1 год. Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору для посиленої хемілюмінесценції ("Amersham", Великобританія). Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем.

Результати і їхнє обговорення

У наших попередніх дослідженнях функціонального стану лейкоцитів методом лектиніндукованої агрегації було показано, що цукровий діабет 1 типу супроводжується збільшенням місць зв'язування для лектину SNA та зменшенням сайтів зв'язування для лектину MAA, що може свідчити про заміну ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язаних сіалових кислот на ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язані сіалові кислоти [1]. Модифікація типу глікозидного зв'язку, можливо, спричинена de novo в цих клітинах у результаті зміни кількості або активності ферменту ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-сіалілтрансферази.

Під час рециклічних процесів глікокон'югати з клітинної поверхні зазнають десіалювання в ендосомах і лізосомах, а також можуть повертатися в апарат Гольджі та підлягати ресіалюванню. Окрім сіалідаз лізосомального й ендосомального походження, клітини ссавців містять поверхневі (зв'язані з плазматичною мембраною) і цитоплазматичні сіалідази. Мембранозв'язані сіалідази переважно беруть участь у раптовому злущуванні сіалових кислот з поверхневих глікокон'югатів. Таке злущування трапляється у процесі активації певного типу клітин, зокрема лейкоцитів. Сіалідази набагато легше гідролізують

$\alpha(2\rightarrow3)$ -зв'язані, ніж приєднані $\alpha(2\rightarrow6)$ -глікозидним зв'язком сіалові кислоти. Показано також, що $\alpha(2\rightarrow6)$ -сіалілтрансферазна активність знижується при біосинтезі О-гліканів плазматичної мембрани Т-лімфоцитів у процесі їхньої активації [7]. У літературі зустрічаються дані про те, що лейкоцитарний рецептор CD3 містить $\alpha(2\rightarrow3)$ -приєднані сіалові кислоти, які можна визначити за допомогою лектину МАА. Водночас показано, що порушення структури вуглеводної детермінанти глікопротеїнової субодиниці CD3- γ або CD3- ϵ у складі CD3 рецептора призводить до пригнічення дозрівання Т-клітин і, як наслідок, до розвитку імунodefіцитів. При цукровому діабеті 1 типу імунцитохімічним методом було виявлено зменшення кількості CD3 Pan Т-антигену [4, 14]. Тому зниження кількості $\alpha(2\rightarrow3)$ -приєднаних сіалових кислот на фоні підвищенням кількості $\alpha(2\rightarrow6)$ -зв'язаних сіалових кислот на поверхні мононуклеарів розкриває молекулярний механізм, що опосередковує пригнічення активності Т-лімфоцитів за умов цукрового діабету 1 типу.

Підвищення кількості $\alpha(2\rightarrow6)$ -приєднаних термінальних сіалових кислот клітинної поверхні мононуклеарних лейкоцитів, поруч зі зниженням кількості $\alpha(2\rightarrow3)$ -приєднаних може свідчити про підвищену сенсibiliзацію до стимуляції В-лімфоцитів за цукрового діабету 1 типу. З літератури відомо, що $\alpha(2\rightarrow6)$ -зв'язані сіалові кислоти здебільшого виявляються на CD19-експресуючих лейкоцитах [2, 17]. Цей рецептор виконує функцію ініціюючого при антигенній стимуляції В-лімфоцитів (його цитоплазматична частина фосфорилується, що веде до приєднання Src-кіназ із залученням PI-3'-кінази) [3, 6]. У хворих на цукровий діабет 1 типу спостерігається підвищена кількість CD19⁺ лейкоцитів [2].

Виявлене різке зниження агрегаційної здатності лейкоцитів при використанні у ролі індукторів агрегації лектинів за умов попередньої преінкубації клітин з вортманіном, який є селективним неконкурентним інгібітором PI-3'-кінази, свідчить про активну участь цього ферменту в перегрупованні рецепторного апарату на поверхні клітин крові та у реалізації міжклітинних взаємодій при досліджуваній патології за участю сіаловмісних глікопротеїнів мембрани лейкоцитів [1, 11]. **Тому важливим було з'ясувати динаміку транслокації p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази у разі трансдукції сигналу, викликаного зв'язуванням сіалоспецифічних лектинів із вуглеводними детермінантами глікокон'югатів мембрани лейкоцитів.**

Методом імуноблот-аналізу було встановлено, що за умов 30-секундної преінкубації мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів з лектином зародків пшениці (WGA) p85 α регуляторна субодиниця із мембрани транслокується у цитозольну фракцію, спостерігалось зростання вмісту даної субодиниці на 20% (рис. 1), а вже на 1 хвилину інкубації зростання вмісту даної субодиниці у мембранній фракції на 35%. Отримані дані вказують на активну участь PI-3'-кінази у проведенні внутрішньоклітинного лектиніндукованого сигналу й активацію даного ензиму на 1 хв преінкубації з WGA. Зниження рівня p85 α у мембранній фракції та зростання у цитозольній фракції починається з 2 хв і триває до 15 хв (рис. 1), вказуючи на те, що PI-3'-кіназа після виконання своєї сигнальної функції повертається у цитозольну фракцію і переходить у неактивний стан.

При цукровому діабеті ми спостерігали аналогічну картину, хоча часова динаміка активної відповіді PI-3'-кінази на дію лектину при патології була зміщена на 1 хв. Максимальний вміст p85 α у мембранній фракції при діабеті виявили на 2 хв преінкубації (рис. 1). Таким чином, при цукровому діабеті 1 типу відповідь клітин мононуклеарного ряду на індукуючий вплив WGA є уповільненою, порівняно з клітинами здорових донорів.

Після індукуючого впливу SNA в мононуклеарах здорових донорів регуляторна субодиниця PI-3'-кінази транслокувалася із мембранної фракції у цитозольну на 30 с преінку-

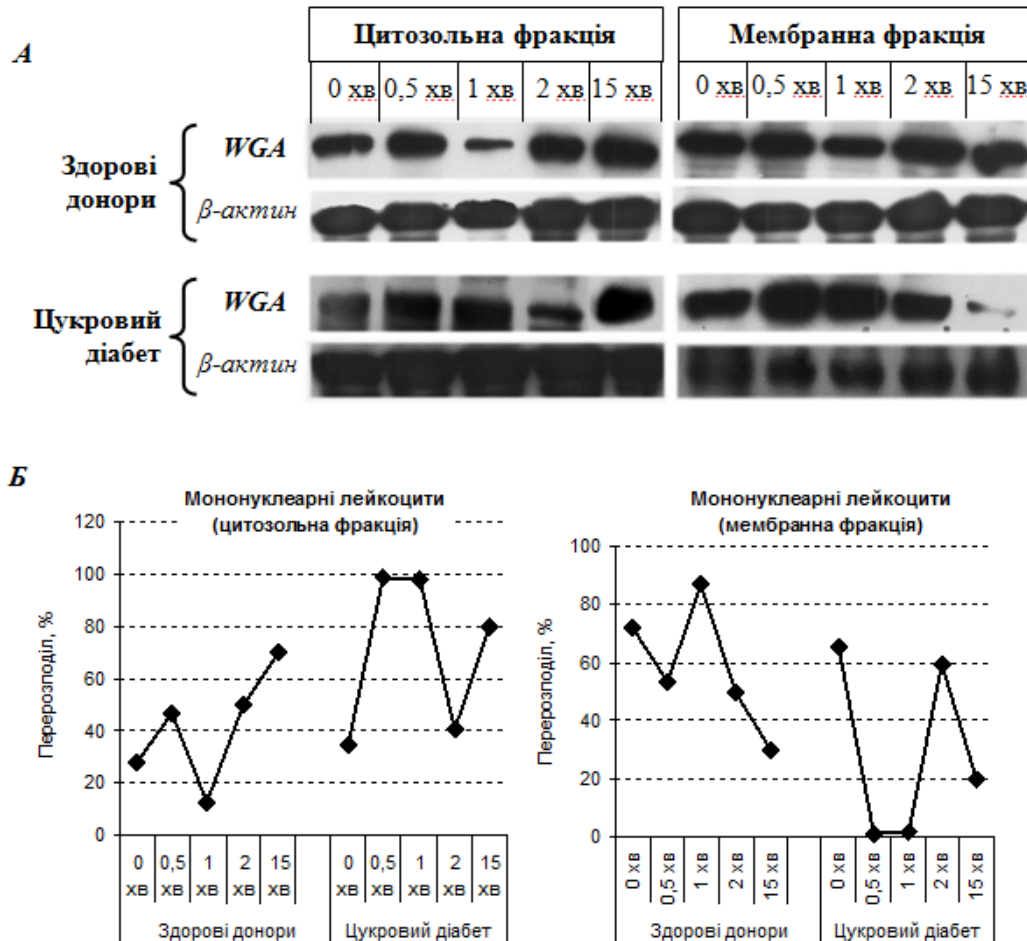


Рис. 1. Імуноблот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов преінкубації клітин з лектином WGA (A) та динаміка перерозподілу (за вмістом, у %) p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (B).

бації, а на 1 хвилину інкубації, навпаки, – з цитозолу в мембрану (рис. 2). Зниження рівня p85 α у мембранній фракції та зростання у цитозольній фракції починається з 2 хв і триває до 15 хв (рис. 2). Внаслідок такого переміщення рівень p85 α / PI-3'-кінази до кінця 15 хв преінкубації у цитозолі мононуклеарів збільшився із 30 до 62%, а у мембранній фракції відповідно знизився із 70 до 38%.

Під час преінкубації мононуклеарних лейкоцитів крові людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, зі сіалоспецифічним лектином SNA досліджено коливний характер транслокації p85 α / PI-3'-кінази між мембранною і цитозольною фракціями. При діабеті високий вміст p85 α у мембранній фракції виявлено вже на 30 с, а тоді на 2 хв преінкубації з даним лектином (рис. 2). До кінця 15 хв інкубації клітин з SNA рівень p85 α регуляторної субодиниці у мембранній фракції знизився до 3% (рис. 2).

Сіалоспецифічний лектин акації амурської (MAA) викликав аналогічне зростання вмісту регуляторної субодиниці PI-3'-кінази у мембранній фракції мононуклеарів здоро-

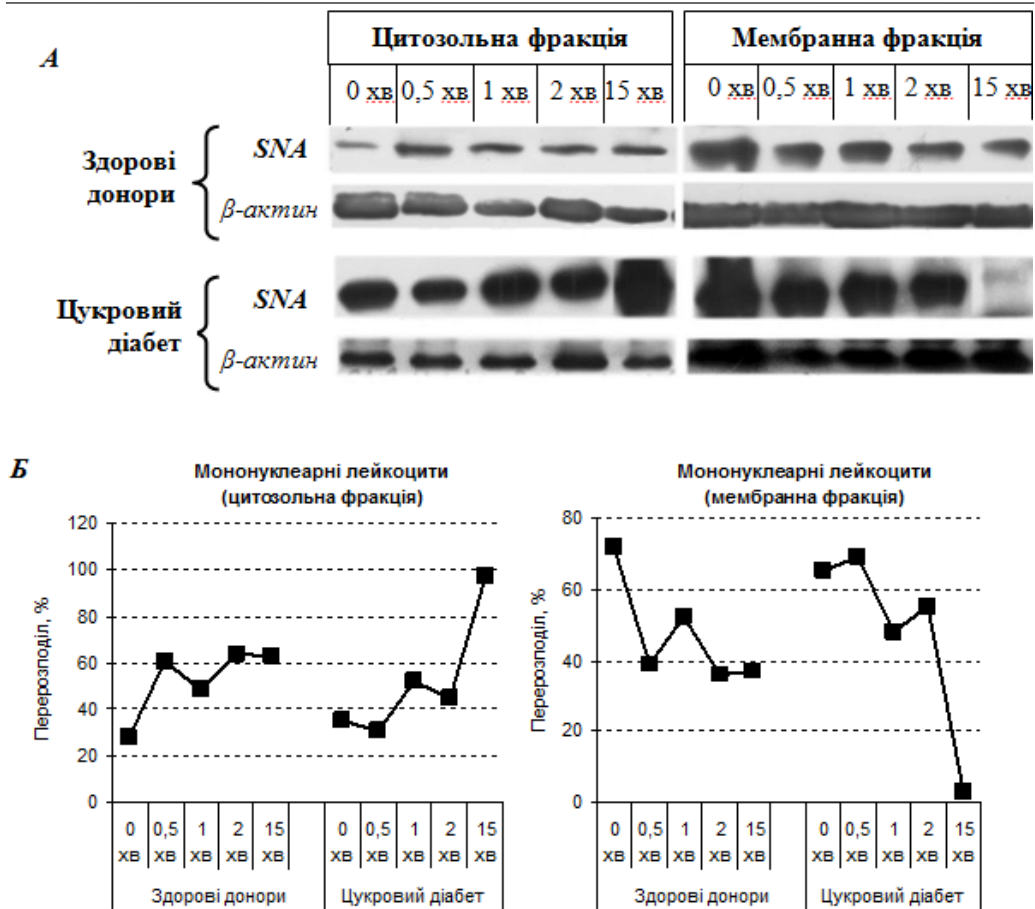


Рис. 2. Імуноблот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов преінкубації клітин з лектином SNA (А) та рівень перерозподілу (за вмістом, у %) р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (Б).

вих донорів на 1 хв індукуючого впливу (рис. 3). На відміну від впливу лектинів WGA і SNA, на 2 хв інкубації з лектином MAA у мембрані мононуклеарних лейкоцитів вміст р85α знизився з 65 до 5%, проте на 15 хв преінкубації – збільшився до 20%.

За умов 30 с і 1 хв преінкубації мононуклеарів крові людей, хворих на діабет, з лектином MAA виявлено незначний перерозподіл регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між цитозольною і мембранною фракціями. При цукровому діабеті після 15 хв індукуючого впливу лектину MAA на мононуклеарні лейкоцити р85α / PI-3'-кіназа транслокується із мембранної фракції у цитозольну, внаслідок чого її рівень у цитозолі мононуклеарів збільшився до 97% та зменшився у мембрані до 3% (рис. 3). Такі результати цілком підтверджують попередньо отримані дані лектиніндукованої агрегації лейкоцитів з лектином MAA.

Порівняльний аналіз впливу всіх трьох сіалоспецифічних лектинів WGA, SNA і MAA на рівень перерозподілу р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між цитозольною та мембранною фракціями мононуклеарних лейкоцитів як у здорових донорів, так і при цукровому діабеті, представлено на рис. 4.

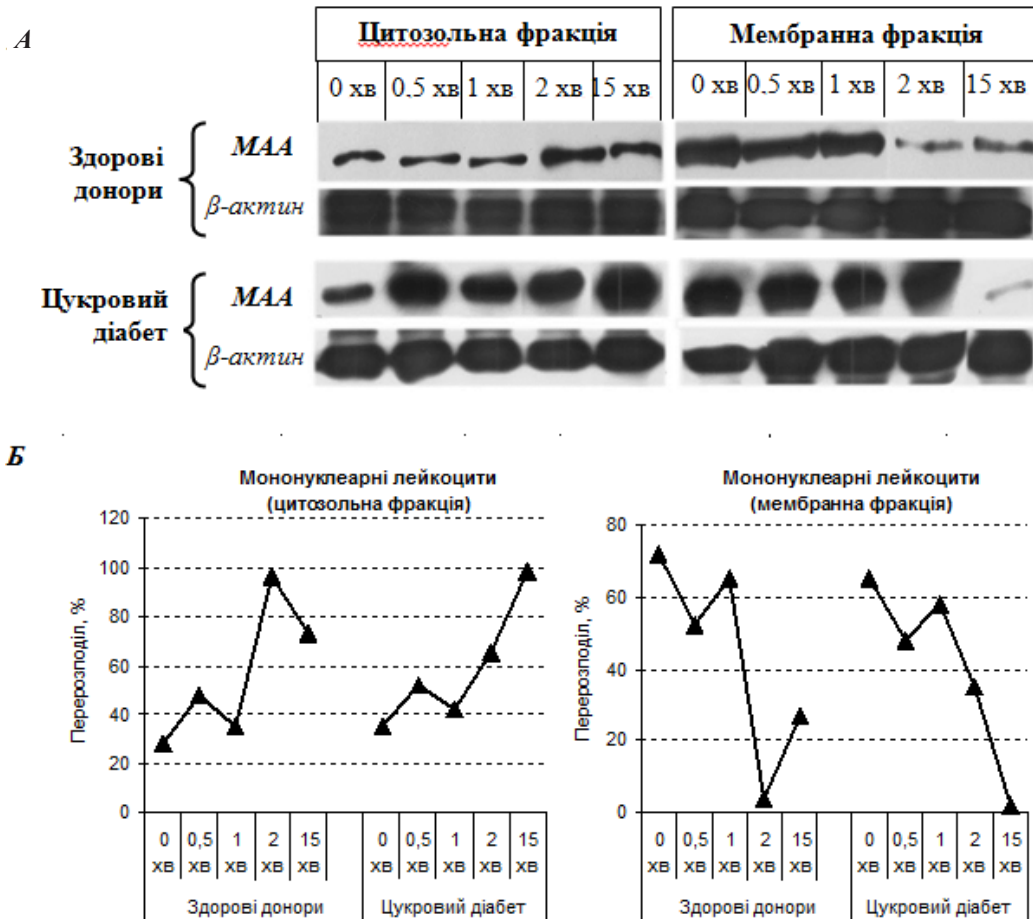


Рис. 3. Імуноблот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до р85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов преінкубації клітин з лектином МАА (А) та рівень перерозподілу (за вмістом, у %) р85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (Б).

Таким чином, у характері відповіді мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів на лектиніндукований вплив щодо рівня транслокації р85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між цитозолем і мембраною простежується практично однаковий напрямок змін (рис. 4). За умов цукрового діабету 1 типу в перерозподілі р85 α після стимулюючого впливу сіалоспецифічних лектинів виявлено: найвищий вміст р85 α регуляторної субодиниці у мембранній фракції при дії лектину SNA на 30 с преінкубації, при дії лектину МАА – на 1 хв, при дії лектину WGA – на 2 хв; найнижчий вміст даної регуляторної субодиниці у мембранній фракції був на 15 хв преінкубації мононуклеарних лейкоцитів за умов впливу усіх трьох сіалоспецифічних лектинів (рис. 4). Трансдукція збуджуючого сигналу йде через фермент PI-3'-кіназу, а сприймається через глікопротеїнові рецептори з термінальною сіаловою кислотою. Зниження вмісту сіалових кислот приєднаних $\alpha(2\rightarrow3)$ глікозидним зв'язком до субтермінальних вуглеводних детермінант, сприймаючого сигнал рецептора, мононуклеарних лейкоцитів при діабеті, зумовлює активний перерозподіл р85 α регулятор-

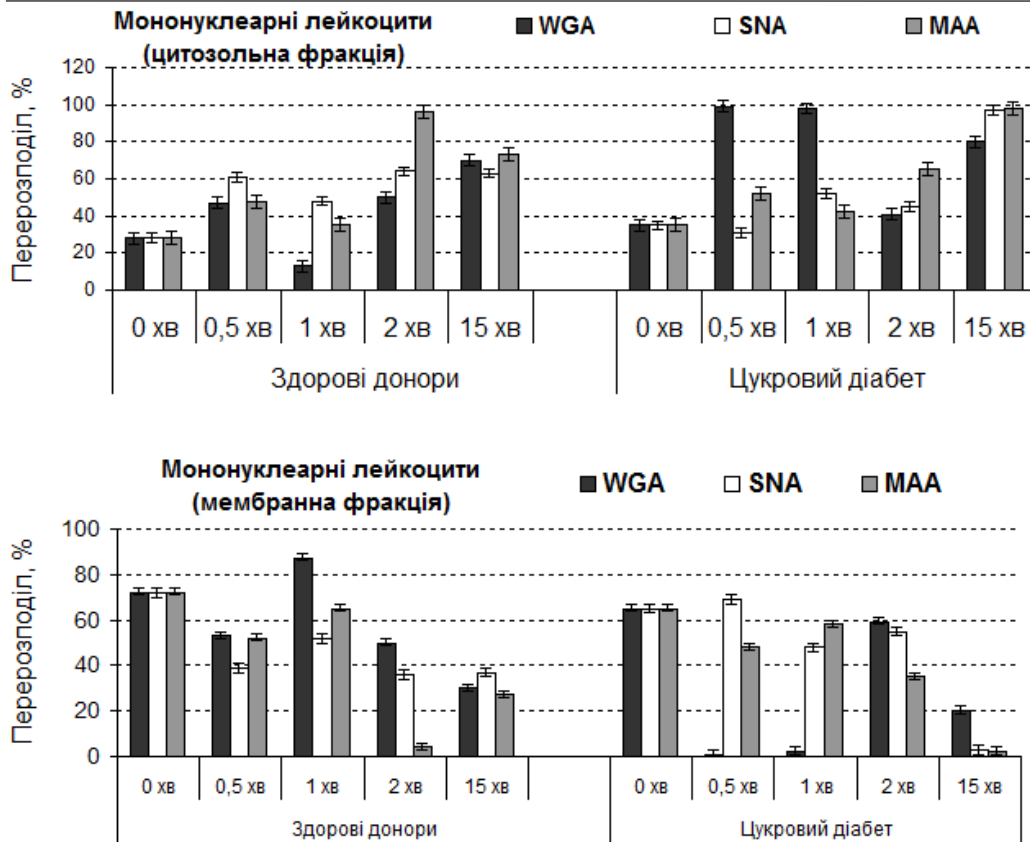


Рис. 4. Рівень перерозподілу p85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між цитозольною та мембранною фракціями мононуклеарних лейкоцитів.

ної субодиниці лише на 1 хв преінкубації цих клітин з лектином MAA. Тоді як лектин SNA, який взаємодіє з α(2→6)-приєднаними сіаловими кислотами, викликає перерозподіл p85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази вже на 30 с преінкубації.

У поліморфноядерних лейкоцитах здорових донорів p85α детектувалася із розподілом між цитозольною та мембранною фракціями у співвідношенні 20% до 80% (рис. 5–6). У разі преінкубації нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів з лектинами WGA і SNA рівень p85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази перерозподілявся між мембранною та цитозольною фракціями у такому співвідношенні: на 30 с впливу цих лектинів вміст p85α збільшився до 45% у цитозольній фракції та відповідно зменшився у мембранній до 55% (рис. 5–6). За умов 1 хв інкубації така динаміка транслокації була ще більш вираженою: у цитозольній фракції вміст p85α субодиниці збільшився до 60%, а у мембранній – зменшився до 40%. На 2 та 15 хв впливу лектинів WGA і SNA p85α регуляторна субодиниця PI-3'-кінази перерозподілялася між цитозолом і мембраною у співвідношенні 40–45% до 60–55% (рис. 5–6). Таким чином, за умов довготривалої лектиніндукованої стимуляції нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів p85α регуляторна субодиниця PI-3'-кінази практично рівномірно розподілялася між цитозольною та мембранною фракціями.

У лізатах нейтрофільних гранулоцитів людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, p85α регуляторна субодиниця PI-3'-кінази була локалізована в основному в цитозольній

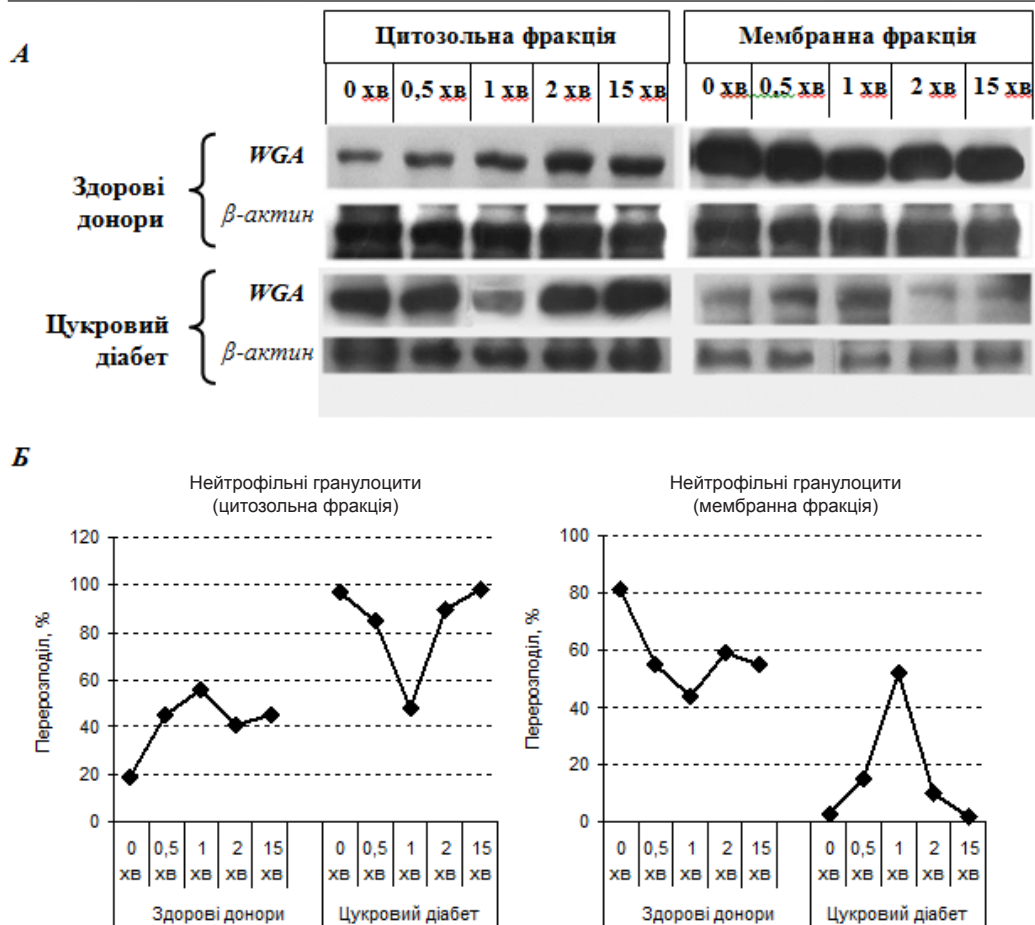


Рис. 5. Імуноблот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції поліморфноядерних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до р85а регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов преінкубації клітин з лектином WGA (А) та динаміка перерозподілу (за вмістом, у %) р85а регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (Б).

фракції. За умов досліджуваної патології 30 с преінкубація нейтрофільних гранулоцитів з лектинами WGA і SNA викликала поступове переміщення р85а регуляторної субодиниці PI-3'-кінази з цитозолу у мембрану (рис. 5–6). При діабеті на 1 хв інкубації клітин з лектинами WGA і SNA виявлено максимальний вміст р85а у мембранній фракції, який збільшився з 3 до 55% та з 2 до 50% відповідно (рис. 5–6), а починаючи з 2 до 15 хв лектиніндукованого впливу регуляторна субодиниця даного ензиму транслокувалася назад у цитозольну фракцію.

При інкубації нейтрофільних гранулоцитів здорових донорів з лектином МАА впродовж 30 с і 1 хв (рис. 7) р85а регуляторна субодиниця PI-3'-кінази транслокувалася з мембранної фракції у цитозольну, де її вміст зростав з 20 до 60%. Двохвилинна преінкубація нейтрофілів з лектином МАА зумовлювала більш помітний перерозподіл регуляторної субодиниці PI-3'-кінази: у цитозольній фракції вміст р85а субодиниці зменшився до 30%, а у мембранній збільшився до 70% (рис. 7). До кінця 15 хв інкубації клітин з МАА

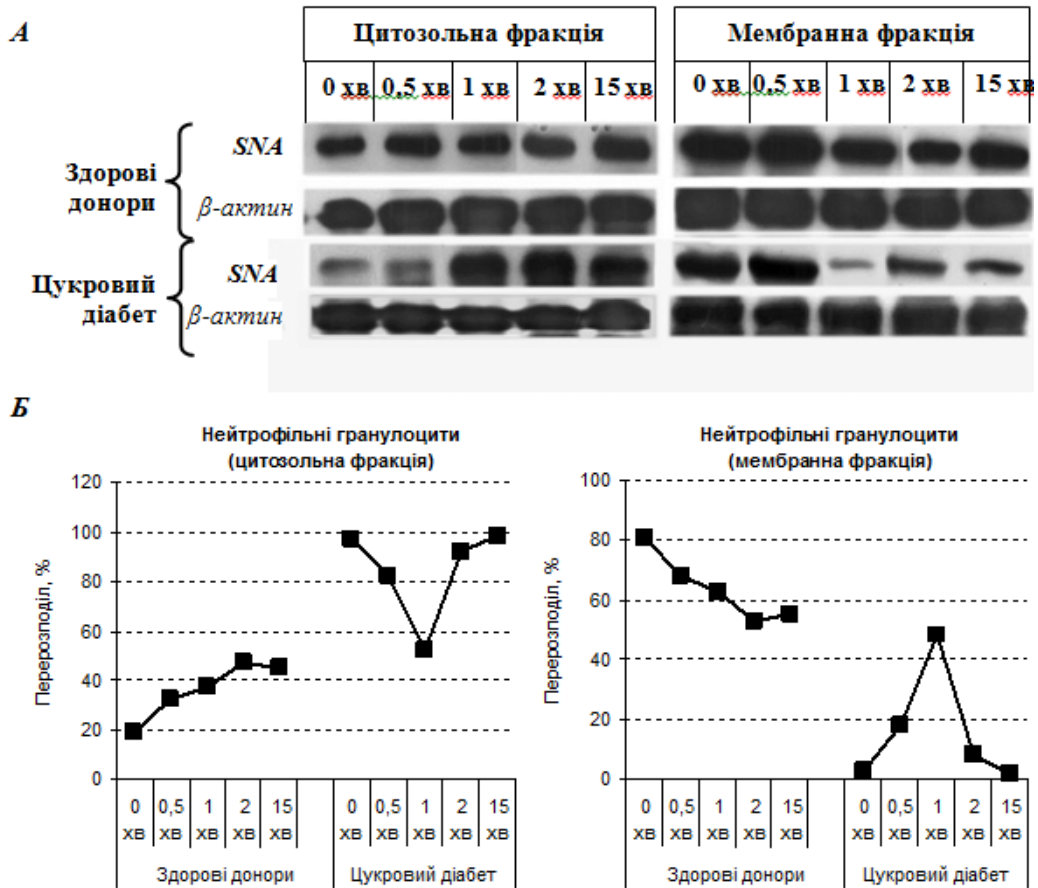


Рис. 6. Імуноблот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції поліморфноядерних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов преінкубації клітин з лектином SNA (А) та динаміка перерозподілу (за вмістом, у %) р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (Б).

спостерігався протилежний напрям перерозподілу досліджуваної субодиниці: рівень р85α регуляторної субодиниці у мембранній фракції знизився до 3% і збільшився до 97% у цитозольній фракції поліморфноядерних лейкоцитів здорових донорів (рис. 7).

У лізатах нейтрофільних гранулоцитів людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, р85α регуляторна субодиниця PI-3'-кінази була локалізована в основному в цитозольній фракції (рис. 7). За умов досліджуваної патології преінкубація нейтрофільних гранулоцитів з лектином МАА не впливала на рівень перерозподілу р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази, яка так і залишалася у цитозольній фракції (рис. 7).

Після індукуючого впливу лектинів WGA, SNA і МАА нами було з'ясовано, що сіаловмісні глікопротеїни поліморфноядерних лейкоцитів периферичної крові задіяні у проведенні внутрішньоклітинного сигналу, який викликає зміни у транслокації р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між мембраною і цитозолом (рис. 8).

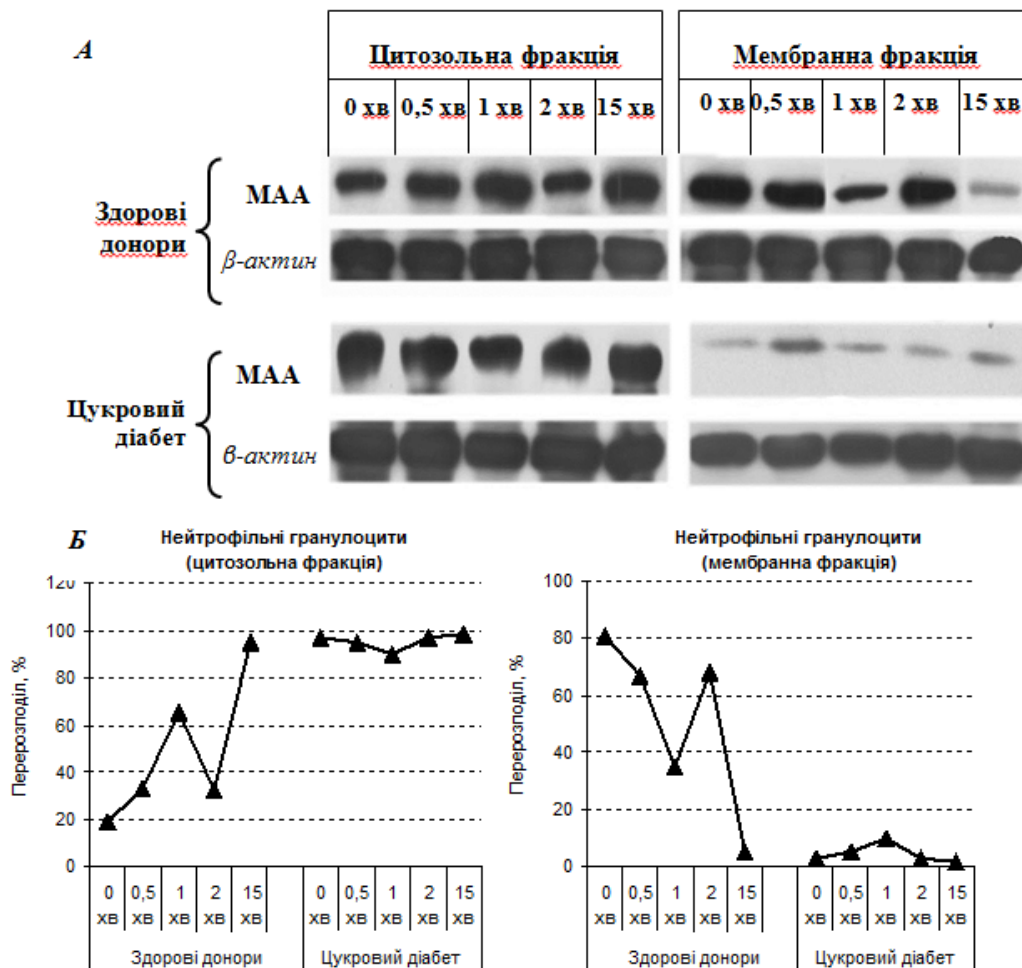


Рис. 7. Імуноблот-аналіз білків цитозольної та мембранної фракції поліморфноядерних лейкоцитів здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1 типу, з використанням антитіл до p85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов преінкубації клітин з лектином MAA (А) та динаміка перерозподілу (за вмістом, у %) p85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (Б).

За умов цукрового діабету 1 типу відповіді, пов'язаної із транслокацією досліджуваного ферменту після MAA-індукуючого впливу на нейтрофіли, на відміну від дії лектинів WGA і SNA, не рееструвалося (рис. 8). Це може бути пов'язане зі зміною кількості або структури плазматичних рецепторів, які містять NeuNAc(α2→3)DGal/DgalNAc-дисахаридні фрагменти, або із порушенням проведення сигналу через PI-3'-кіназний шлях у нейтрофільних гранулоцитах при діабеті.

Після індукуючого впливу лектинів WGA, SNA і MAA було з'ясовано, що сіаловмісні глікопротеїни лейкоцитів крові задіяні у проведенні внутрішньоклітинного сигналу, який викликає зміни у транслокації p85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між мембраною і цитозолем.

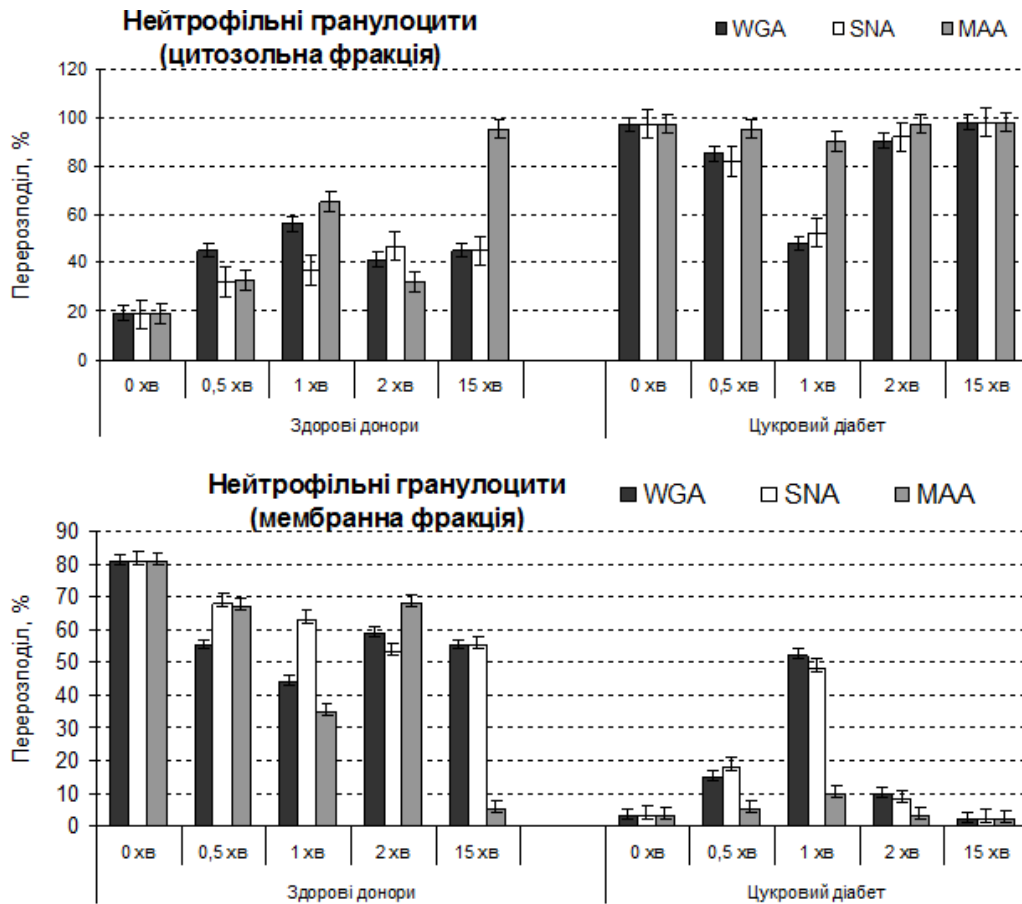


Рис. 8. Рівень перерозподілу р85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між цитозольною та мембранною фракціями поліморфноядерних лейкоцитів.

За умов цукрового діабету 1 типу клітинна відповідь, пов'язана із транслокацією р85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази після лектиніндукованого впливу на нейтрофіли та мононуклеари, відрізнялася для різних лектинів за своєю інтенсивністю й формуванням у часі, що може бути пов'язане зі зміною кількості або структури плазматичних глікопротеїнових рецепторів, які містять $\alpha(2\rightarrow3)$ - та $\alpha(2\rightarrow6)$ -зв'язані термінальні сіалові кислоти.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Здіорук М. І., Барська М. Л., Бродяк І. В. та ін. Вплив вортманіну на агрегаційну здатність нейтрофільних гранулоцитів за умов цукрового діабету 1-го типу // Біологічні студії. 2009. Т. 3. № 2. С. 133–140.
2. Сибірня 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. С. 47–50.

3. 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. N 3. P. 1497–1503.
4. Arnaiz-Villena A., Timon M., Corell A. et al. Primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3- γ subunit of the T lymphocyte receptor // *N. Engl. J. Med.* 1992. N 327. P. 529–533.
5. Dodd R.B., Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity // *Glycobiology*. 2001. N 11. P. 71R–79R.
6. 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. N 114. P. 51–58.
7. Harduin-Lepers A., Mollicone R., Delannoy P., Oriol R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: A phylogenetic approach // *Glycobiology*. 2005. N 15. P. 805–817.
8. 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. N 13. P.6052–6063.
9. Kopff M., Zakrzewska I., Klem I. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, immunity, homeostasis, and cancer // *Acta Biochimica Polonica*. 1997. Vol. 44. N 2. P. 359–362.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. N 277. P. 680–685.
11. 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. N 269. P. 3563–3567.
12. Rudiger H., Gabius H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications // *Glycoconj J.* 2001. N 18. P. 589–613.
13. Sharon N., Lis H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology*. 2004. N 14. 53R–62R.
14. 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. N 3. P. 77–81.
15. 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. N 17. P. 162–172.
16. Sybirna N. A., Barska M. L. Neutrophils functional state under insulin-dependent diabetes mellitus // *Laboratory Diagnostics*. 2003. N 2. P. 33–37.
17. Tavares S., Stopa E., Robbins S. Differential Distribution of the JC Virus Receptor-Type Sialic Acid in Normal Human Tissues // *Am. J. Pathol.* 2004. Vol. 164. P. 419–428.

Стаття: надійшла до редакції 03.03.11

доопрацьована 10.05.11

прийнята до друку 12.05.11

**MOLECULAR MECHANISMS IN LECTIN INDUCED SIGNAL TRANSDUCTION
IN HUMAN LEUKOCYTES UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS**

M. Zdioruk, I. Brodyak, N. Sybirna

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

The content of PI-3'-kinase enzyme p85alpha regulatory subunit in leukocytes from healthy donors and patients with type 1 diabetes mellitus was investigated. It was shown that binding of lectins to carbohydrate determinants of membrane glycoconjugates of leukocytes mediated signal transduction through PI-3'-kinase. It was shown that under diabetes cell reaction, which is registered as a translocation of the regulatory subunit of the enzyme PI-3'-kinase after the lectin induced effects on neutrophils and mononuclear cells, was different in intensity and the formation in time for the WGA, SNA, MAA, which may be associated with the quantitative and structural changes in plasma glycoprotein receptors that contain $\alpha(2\rightarrow3)$ - and $\alpha(2\rightarrow6)$ -attached terminal sialic acid.

Key words: neutrophilic granulocytes, mononuclear leukocytes, phosphatidylinositol-3'-kinase, type 1 diabetes mellitus.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСДУКЦИИ
ЛЕКТИНИНДУЦИРОВАННОГО СИГНАЛА В ЛЕЙКОЦИТАХ ЛЮДЕЙ,
БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА**

Н. Здіорук, І. Бродяк, Н. Сибірна

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

Определено содержание р85-альфа регуляторной субъединицы фермента фосфатидилинозитол-3'-киназы (PI-3'-киназы) лейкоцитов здоровых доноров и больных сахарным диабетом 1 типа. Выяснено, что трансдукция сигнала, вызванного связыванием сиалоспецифических лектинов с углеводными детерминантами гликоконъюгатов мембран лейкоцитов, опосредуется PI-3'-киназным путём. Показано, что при сахарном диабете клеточная реакция, которая регистрируется как транслокация регуляторной субъединицы фермента PI-3'-киназы после лектининдуцированного влияния на нейтрофилы и мононуклеары, отличалась своей интенсивностью и формированием во времени для WGA, SNA и MAA, что может быть связано с изменением количества или структуры плазматических гликопротеиновых рецепторов, которые содержат $\alpha(2\rightarrow3)$ - и $\alpha(2\rightarrow6)$ -присоединённые терминальные сиаловые кислоты.

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