

Н.О. Сибірна, І.В. Бродяк, М.Л. Барська, О.І. Вовк

Участь ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази у сприйнятті та передачі сигналів через галактозовмісні глікопротеїнові рецептори сегментоядерних лейкоцитів при цукровому діабеті 1-го типу

Показано, що зменшення вмісту β ,D-галактозовмісних вуглеводних детермінант глікокон'югатів на плазматичній мембрані сегментоядерних нейтрофілів периферичної крові за умов цукрового діабету 1-го типу корелює зі змінами агрегаційної здатності цих клітин і може порушувати їхній функціональний стан. Зміни показників рициніндукованої агрегації нейтрофілів після інгібування ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кінази) вортманіном вказує на те, що функціональний стан поліморфноядерних лейкоцитів опосередковується сигнальними шляхами, до яких залучена PI-3'-кіназа. Таким чином, PI-3'-кіназозалежні сигнальні мережі задіяні в процесах сприйняття і передачі сигналів через галактозиловмісні глікопротеїнові рецептори в середину нейтрофільних лейкоцитів. Інертність щодо інтенсивності формування у часі клітинної відповіді нейтрофільних гранулоцитів на RCA-індуковану транслокацію р85 α -регуляторної субодиниці PI-3'-кінази із цитозольної у мембранну фракцію за умов цукрового діабету 1-го типу є наслідком зміни кількості або структури плазматичних галактозиловмісних глікопротеїнових рецепторів. Виявлені зміни можуть бути однією з етіологічних передумов діабетичних ускладнень та розвитку хронічних захворювань, що погіршують стан хворих на цукровий діабет 1-го типу.

Ключові слова: нейтрофільні гранулоцити, β ,D-галактозовмісні вуглеводні детермінанти глікокон'югатів, PI-3'-кіназа, вортманін, цукровий діабет 1-го типу.

ВСТУП

Екстрацелюлярні ділянки білків плазматичної мембрани клітин зазвичай є глікозилітованими. Саме тому зовнішня поверхня мембрани вкрита вуглеводною оболонкою, або глікокаліксом, який утворений здебільшого олігосахаридами трансмембранних глікопротеїнів. Окрім захисної функції, олігосахариди глікокаліксу є маркерами для великої кількості міжклітинних контактів, котрі опосередковані мембранними глікопротеїнами, що відіграє вирішальну роль під час росту, розвитку, нормального функціонування та загибелі клітини [34].

Розкриття молекулярних особливостей синтезу, функціональної активності та струк-

тури олігосахаридів – одне із основних завдань клітинної біології. На відміну від інших структурних біомолекул, наприклад білків чи нуклеїнових кислот, синтез яких керований матрицею та чітко визначений на молекулярному рівні, вони не є первинними продуктами генів [17]. Тому і нині чимало деталей механізму синтезу олігосахаридів залишаються невідомими. З іншого боку, порушення в експресії гліканів є причиною як рідкісних спадкових, так і широко розповсюджених захворювань на зразок злоякісних пухлин чи цукрового діабету (ЦД) [35]. Відкриття останніх років показали [19, 35], що людський геном представлений значно меншою кількістю генів, ніж вважали до цього, що ще більше підкреслює важливість

© Н.О. Сибірна, І.В. Бродяк, М.Л. Барська, О.І. Вовк

таких посттрансляційних модифікацій, як глікозилування або сіалювання–десіалювання в формуванні вуглеводних детермінант на плазматичних мембранах клітин вищих еукаріотних організмів.

Вуглеводна специфічність лектинів дає змогу застосовувати їх для детекції певних карбогідратних груп на поверхні клітинних мембран [28]. Це дозволяє створювати набори лектинів для виявлення найбільш типових вуглеводних детермінант і визначення їхньої кількості на поверхні клітини, що в свою чергу дає змогу розпізнавати тканини методами лектиноцитохімії завдяки тканино-специфічній експресії карбогідратів у складі глікопротеїнів. Особлива роль кінцевих моносахаридних залишків у складі молекул глікоолігомерів визначає перспективність і широкі можливості гістохімічних методів, що базуються на використанні мічених лектинів. Останні визнані найбільш інформативними молекулярними зондами, за допомогою яких можна проводити ідентифікацію кінцевих вуглеводних залишків глікокон'югатів, вивчати їхні зміни в фізіологічних і патологічних умовах [23, 24, 29].

Агрегаційну здатність лейкоцитів досліджують для моделювання їхнього передміграційного стану перед виходом із русла крові, тобто перед здійсненням діapedезу [8] або фагоцитарної активності. Вважається, що фагоцитоз за участю лектин-вуглеводних взаємодій є однією з найбільш давніх в еволюційному плані форм цього процесу, що по ходу еволюції був значною мірою витіснений взаємодіями антиген-антитіло, але не втратив свого важливого значення у формуванні неспецифічної імунної відповіді [16]. Поліморфноядерні нейтрофільні лейкоцити є маркери імунного гомеостазу організму. Традиційно, ці клітини належать до фагоцитів, проте фагоцитоз не єдиний спосіб реалізації гранулоцитами своїх ефекторних функцій. Поліморфноядерні лейкоцити – це високоспеціалізовані імунокомпетентні клітини, які у разі їхньої активації синтезують *de novo* та виділяють

біологічно активні речовини, а також через свій рецепторний апарат, представлений в основному глікокон'югатами, сприймають сигнали мікрооточення. Лігандами, що селективно активують рецептори до хемокінів, можуть виступати лектини певної вуглеводної специфічності, а реакція на їхній вплив дає можливість робити висновки про тонку хімічну структуру вуглеводних детермінант глікопротеїнів на мембрані лейкоцитів.

У попередніх наших працях показано, що при ЦД 1-го типу відбувається виражений кількісний перерозподіл сіаловмісних вуглеводних детермінант, що супроводжується змінами у просторовій структурі олігосахаридних компонентів глікопротеїнових рецепторів мембран лейкоцитів периферичної крові [4, 30–31]. Це може бути однією з причин порушення функціонального стану поліморфноядерних лейкоцитів і змінювати агрегаційну й адгезивну здатність цих клітин 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 [5, 7, 14].

У складі вуглеводних компонентів макромолекул тканин ссавців виявлено дев'ять моносахаридів: D-глюкозу, D-манозу, D-галактозу, L-фукозу, D-фруктозу, D-фруктозамін, N-ацетил-D-глюкозамін, N-ацетил-D-галактозамін і N-ацетилнейрамінову (сіалову) кислоту. Остання, як правило, має термінальну позицію у структурі олігосахаридів мембранних глікопротеїнів [26]. Зареєстровані нами відхилення вмісту сіалової кислоти [3, 31] повинні впливати на кількісні зміни субтермінального моносахариду – β -D-галактози (β ,D-Gal), який “демаскується” у разі активації мембранозв'язаних нейрамінідаз. Щоб перевірити експериментально цю гіпотезу, ми дослідили функціональний стан нейтрофільних гранулоцитів (НГ) методом лектиніндукованої агрегації, а також глікопротеїновий спектр поверхні лейкоцитів лектиноцитохімічно та за допомо-

гою лектиноблотингу. Лектин рицини (RCA), який може зв'язувати глікани, що містять нередукуючі термінальні залишки β ,D-Gal, і найвищу афінність виявляє до гліканів із термінальною послідовністю Gal(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc-R, був нами обраний як агоніст, що взаємодіє з вуглеводними детермінантами поверхневих глікокон'югатів.

Преактивація лейкоцитів за умов ЦД 1-го типу у зв'язку із структурно-функціональною перебудовою рецепторного апарату може бути зумовлена зміною у функціональній активності ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кінази), якому надається важливе значення у формуванні локомоторної функції лейкоцитів за умов різних патологій. PI-3'-кіназа, взаємодіючи з інтегриновими рецепторами, бере участь у передачі сигналу в середину клітини, а також формує фокальні контакти на поверхні мембран лейкоцитів. Білки, які є мішенями для PI-3'-кінази, задіяні у реалізації такої клітинної відповіді на зовнішнє подразнення, як формування стресових фібрил, утворення ламелоподій і філоподій, тобто у зміні морфологічного стану клітини і забезпеченні міграційної здатності лейкоцитів [36].

Для вивчення ролі PI-3'-кінази ми досліджували вплив селективного неконкурентного її інгібітора вортманіну на RCA-індуковану агрегаційну здатність лейкоцитів та на динаміку транслокації p85 α регуляторної субодиниці цього ензиму за умов моделювання передміграційного стану нейтрофільних гранулоцитів дією лектину RCA у здорових донорів і хворих на ЦД 1-го типу.

МЕТОДИКА

Клітини. Об'єктом дослідження були НГ з периферичної крові здорових людей і хворих на ЦД 1-го типу. Відбір останніх проводили на базі ендокринологічного відділення, згідно з угодою про співпрацю 4-ї міської лікарні та кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету ім.

Івана Франка. Всі хворі були інформовані щодо проведення досліджень та їхньої мети.

Лектини. Як індуктор агрегації використовували лектин RCA (специфічний до β ,D-галактозовмісних вуглеводних детермінант). Для лектиноцитохімічного аналізу та лектиноблотингу використовували лектин RCA, мічений пероксидазою хрому ("Лектинотест", Україна).

Виділення лейкоцитів. Кров з вени збирали у стерильні силіконові пробірки, до яких попередньо додавали гепарин у співвідношенні 1 : 10 (гепарин : цільна кров). Нейтрофіли виділяли у градієнті густини (1,115 г/см³ \pm 0,002 г/см³ при 20 °С) Gradisol-G ("Aqua-medica", Польща) центрифугуванням, відповідно до інструкції фірми-виробника [21]. Після центрифугування клітини двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР, рН 7,2). Постійно проводився цитологічний контроль кількісного та якісного складу отриманих клітинних популяцій. Гемоліз залишкових еритроцитів у фракції НГ здійснювали з використанням 0,83%-го водного розчину амонію хлористого. Життєздатність клітин у тесті із трипановим синім була не меншою ніж 98 %. Отримані клітини використовували для вивчення лектиніндукованої агрегаційної здатності поліморфноядерних лейкоцитів, лектиноцитохімічних досліджень, лектино- та імуноблотингу.

Інкубація нейтрофілів з вортманіном та отримання субклітинних фракцій. При дослідженні участі PI-3'-кінази у передачі в середину лейкоцитів RCA-індукованого сигналу проводили двоетапну інкубацію суспензій поліморфноядерних лейкоцитів. На першому етапі клітини інкубували із вортманіном при 37 °С протягом 10 хв (кінцева концентрація вортманіну 100 нмоль/л). Після завершення інкубації суспензію НГ центрифугували при 300 g протягом 5 хв. Потім відбирали надосадову рідину, в якій містився вортманін. Осади клітин ресуспендували розчином Хенкса та інкубували при 37 °С упродовж певного проміжку часу з до-

даванням лектину RCA (кінцева концентрація лектину в інкубаційній суміші – 32 мкг/мл). Після цього суспензію НГ центрифугували при 300 g протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину, а осад лейкоцитів лізували, виділяли мембранну та цитозольну фракції. Всі операції з виділення фракцій проводили при 4 °С.

Отримання лізатів лейкоцитів. Лізис лейкоцитів ($10 \cdot 10^6$ клітин/200 мкл буфера) проводили при 4 °С протягом 30 хв у гіпотонічному буфері такого складу (ммоль/л): тріс-НСІ – 10 (рН 7,5), $MgCl_2$ – 1,5, EDTA – 5, EGTA – 5, Na_3VO_4 – 0,25, фенілметилсульфонілфторид – 1, бензамідин – 5, апротинін – 10 мкг/мл, лейпептин – 10 мкг/мл, пепстатин – 2 мкг/мл (“Sigma”, США). Після гомогенізування та лізису зразки центрифугували (10 хв при 20 000 g, 4 °С), відбирали цитозольну фракцію лейкоцитів, яку надалі використовували для блотингу, а осад ресуспендували у 200 мкл 10 ммоль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,5) та додавали 2 М сахарозу (кінцева концентрація 0,25 моль/л). Після центрифугування при 2 000 g упродовж 20 хв при 4 °С відбирали супернатант і додавали 1/3 за об’ємом гіпотонічного буфера. Осад фракції плазматичних мембран одержували центрифугуванням при 20 000 g протягом 90 хв при 4 °С, ресуспендували у мінімальній кількості 10 ммоль/л тріс-НСІ-буфера, рН 7,5. Вихід одержаних фракцій розраховували за концентрацією протеїну, яку оцінювали методом Петерсона.

Отримані лізати різних субклітинних фракцій НГ до використання зберігали при –70 °С. Для проведення електрофоретичного розділення зразки лізатів лейкоцитів, вирівняні за концентрацією білка, прогрівали при 95 °С протягом 5 хв у буфері Лемлі (62,5 ммоль/л тріс-НСІ (рН 6,8), 1 ммоль/л EDTA, 2%-й натрій додецилсульфат (SDS), 5%-й β -меркаптоетанол, 10%-й гліцерол, 0,4%-й бромфеноловий синій).

Дослідження агрегаційної здатності лейкоцитів. Агрегацію НГ визначали стандартним турбідиметричним методом за допомогою двоканального лазерного ана-

лізатора “230 LA Биола” (“НПФ Биола”, Росія) в суспензії відмитих нейтрофілів у концентрації $2,5 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл при 37 °С і перемішуванні зі швидкістю 800 об·хв⁻¹ за зміною світлопропускання. При дослідженні агрегації до 300 мкл суспензії НГ після термостатування протягом 1 хв при 37 °С додавали 10 мкл лектину в концентрації 32 мкг/мл. Процес ресстрували протягом 12–15 хв за зміною світлопропускання клітинної суспензії, показники розраховували за агрегаційною кривою. Ступінь агрегації – максимальний приріст світлопропускання після додавання індуктора виражали у відсотках, швидкість – максимальний нахил кривої світлопропускання після додавання індуктора виражали у відсотках за 1 хв.

Лектиноцитохімічне дослідження НГ. Для лектиноцитохімічного дослідження із суспензії НГ виготовляли мазки, які фіксували сумішшю ацетон : метанол : формалін у співвідношенні 19:19:2 протягом 5 хв при 4 °С з наступним висушуванням при кімнатній температурі. Для пригнічення активності ендогенної пероксидази, після регідратації та промивання ЗФР, мазки обробляли 70%-м метанолом, що містив 5 % H_2O_2 . Далі промивали в трьох змінах ЗФР по 5 хв. Проводили інкубацію з розведеним у ЗФР лектином RCA, міченим пероксидазою хрому, у концентрації 50 мкг/мл. Після 2 год інкубації при кімнатній температурі скельця відмивали в трьох змінах ЗФР по 10 хв. Для негативного контролю мазки в одному випадку інкубували без лектину (в ЗФР); у другому – за наявності 0,5 моль/л вуглеводу-інгібітора (для RCA – моногідрат D-галактози); у третьому – з 1%-м розчином $HI O_4$ в ЗФР протягом 30 хв перед нанесенням лектину.

Щоб виявити в клітинах місця зв’язування міченого пероксидазою лектину RCA, використовували розчини 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду (0,05 %) і H_2O_2 (0,015 %) в ЗФР, інкубацію проводили 3–5 хв при кімнатній температурі з наступним відмиванням скельця у трьох змінах дистильованої води

по 5 хв. Активність пероксидазної реакції і, відповідно, локалізацію зв'язаного з глікокон'югатами лектину визначали за коричневими відкладеннями продуктів окисної полімеризації діамінобензидину в режимі світлової мікроскопії при збільшенні у 1200 разів під імерсійним маслом. Проводили напівкількісну оцінку взаємодії лектину із вуглеводними детермінантами олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнів на поверхні мембран НГ, порівнюючи інтенсивність позитивного забарвлення плазматичних мембран із застосуванням шкали: 0 – немає забарвлення; 1 – слабе забарвлення; 2 – забарвлення помірної інтенсивності; 3 – інтенсивне забарвлення. Для диференціації НГ з позитивною пероксидазною реакцією підраховували клітини з інтенсивністю реакції 3, 2, 1; всього рахували 400 клітин на мазку.

Електрофорез білків у поліакриламідному гелі (ПААГ). Білки розділяли електрофоретично у блоках 10%-го поліакриламідного гелю за наявності SDS у буферній системі Лемлі [22]. У лунки вносили необхідну кількість білкового препарату (максимально 80 мкг на трек). Електрофорез 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 фірми “Fermentas” (Литва).

Лектино- та імуноблотинг білків. В основу методу покладено перенесення білків з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля з наступною обробкою отриманих блотів лектинами. Перенесення здійснювали протягом 2 год при силі струму 250 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт у буфері, що містив: 25 ммоль/л тріс-НСІ (рН 8,3), 20 % метанолу, 192 ммоль/л гліцину, 0,1 % SDS. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 2 год 4%-м бичачим сироватковим альбуміном у TBS (50 ммоль/л тріс, рН 7,5; 150 ммоль/л NaCl) з 0,05%-м твін-20. Далі мембрану інкубували з лектином RCA, кон'югованим з пероксида-

зою хрону, у блокувальному буфері протягом 2 год з наступним промиванням у ньому ж (5 разів по 3 хв), після чого мембрану відмивали ЗФР з 0,1%-м твін-20 (5 разів по 3 хв). Для негативного контролю мембрану інкубували за наявності 0,5 М відповідного вуглеводу-інгібітора (для RCA – моногідрат D-галактози).

Після перенесення білків з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля отримані блоти обробляли відповідними антитілами. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5%-м сухим знежиреним молоком у ЗФР (ммоль/л): NaCl – 137, KCl – 2,7, Na₂HPO₄ – 4,3, KH₂PO₄ – 1,7; рН 7,3 з 0,05 % твін-20. Відповідно до поставленої мети мембрану інкубували з розведеними згідно з рекомендаціями фірми-виробника (“Millipore”, США) моноклональними антитілами до р85α-субодиниці у блокувальному буфері протягом 2 год з наступним промиванням у ньому ж (5 разів по 3 хв). Як вторинні антитіла використовували анти-мишачі IgG (“Millipore”, США), кон'юговані з пероксидазою хрону, в розведенні 1:1000 у блокувальному буфері. Інкубацію з вторинними антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали ЗФР, що містив 0,1 % твіну-20 (5 разів по 3 хв). Вирівнювання за протеїном у досліджуваних зразках проводили за інтенсивністю сигналу імунореактивних смуг, які виявлялися під час застосування моноклональних анти-β-актин антитіл (“Sigma”, США).

Лектино- чи імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору для посиленої хемілюмінесценції (“Amersham”, Великобританія). Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз результатів імуноблотингу здійснювали за допомогою програми Gelpro32.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження функціонального стану нейтрофільних гранулоцитів методом лектин-

індукованої агрегації. Сильна та швидка RCA-індукована агрегація НГ здорових донорів (табл. 1) вказує на те, що у структурі глікопротеїнових рецепторів мембрани нейтрофілів у значній кількості наявні галактозовмісні детермінанти. За умов ЦД 1-го типу виявляється зниження показників агрегаційної здатності НГ при використанні RCA (див. табл. 1). Як відомо, β ,D-галактозовмісні рецептори характерні для клітин низького рівня диференціації у гранулоцитарному ростку, тобто для умовно молодих клітин [1, 23], тому отримані результати можуть опосередковано свідчити про зміну схеми диференціації нейтрофільних лейкоцитів у бік пришвидшеного старіння. У наших попередніх дослідженнях було показано [2], що при діабеті суттєво зростає частота морфологічних ознак апоптозу та збільшується число CD95-позитивних НГ. Отже, показники RCA-індукованої агрегації вказують на зменшення пулу функціонально зрілих НГ.

Поверхневі глікокон'югати із термінальними залишками β ,D-галактози частіше експонуються на поверхні плазматичної мембрани пошкоджених клітин і відіграють роль при елімінації цих клітин системою мононуклеарних фагоцитів [6, 28]. β ,D-галактозовмісні глікокон'югати задіяні в молекулярних механізмах міжклітинної адгезії [19–20], а зменшення їхньої кількості на поверхні НГ свідчить про порушення цієї функції у хворих на ЦД 1-го типу.

Лектиноцитохімічний аналіз нейтрофільних гранулоцитів з використанням лектину RCA. Застосувавши лектин RCA для цитохімічного дослідження природи вуглевод-

них детермінант, було отримано результати лектиноцитохімічного аналізу карбогідратів плазматичної мембрани НГ у здорових людей та хворих на ЦД 1-го типу (рис. 1, табл. 2). За умов діабету показано статистично достовірне зниження інтенсивності позитивного забарвлення плазматичних мембран НГ у пероксидазній реакції з діамінобензидином при застосуванні лектину RCA, міченого пероксидазою хрому, що свідчить про зниження кількості поверхневих глікопротеїнів із термінальними залишками β ,D-галактози у складі плазматичної мембрани цих клітин.

За допомогою лектиноцитохімічного аналізу та лектиніндукованої агрегації встановлено пряму відповідність між зв'язуванням лектинів із глікокон'югатами мембрани НГ і їхньою здатністю індукувати агрегацію цих клітин крові. Чим вищою була інтенсивність зв'язування лектинів з поверхнею фіксованих на мазку клітин (див. рис. 1, табл. 2), тим вищими були ступінь та швидкість агрегації в суспензії НГ (див. табл. 1).

Відомо, що поверхневі глікопротеїни із термінальними залишками β ,D-галактози задіяні в молекулярних механізмах адгезії НГ до чужорідних антигенів під час здійснення фагоцитозу. Тому зменшення кількості β ,D-галактозовмісних глікопротеїнових рецепторів на поверхні НГ може спричинити пригнічення фагоцитарної функції цих клітин за ЦД 1-го типу. Галактозовмісні глікокон'югати залучаються у механізми формування неспецифічної та специфічної імунної відповіді [1, 5]. Крім того, через залишки β ,D-галактози посилюється хемотаксис та активується кисневий вибух НГ *in vitro*. Цей

Таблиця 1. Показники RCA-індукованої агрегації нейтрофільних гранулоцитів у хворих на цукровий діабет 1-го типу ($M \pm m$; $n = 12-14$)

Групи обстежених	Ступінь агрегації, %		Швидкість агрегації, %/хв	
	без вортманіну	з вортманіном	без вортманіну	з вортманіном
Здорові донори	95,8 \pm 1,1	43,3 \pm 4,1**	45,2 \pm 1,9	25,0 \pm 2,2**
Цукровий діабет	82,7 \pm 3,2*	53,6 \pm 5,4**	41,8 \pm 4,0	28,7 \pm 3,0**

* $P < 0,05$ – порівняно з контролем, ** $P < 0,01$ – без впливу вортманіну.

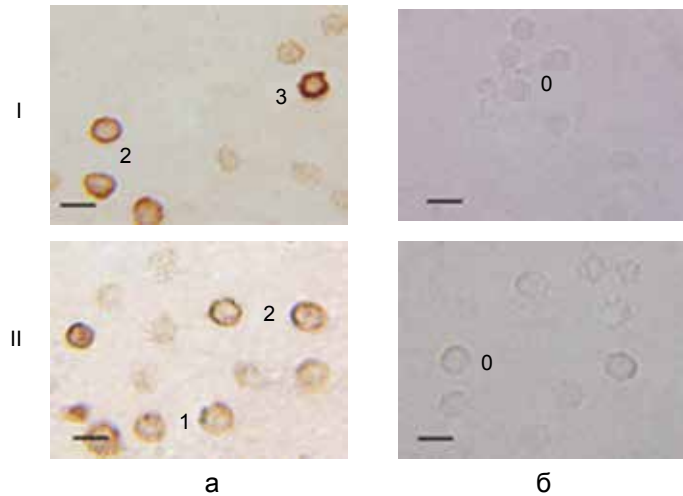


Рис. 1. Лектиноцитохімічний аналіз поліморфноядерних лейкоцитів крові здорових людей (I) та хворих на цукровий діабет 1-го типу (II), а – інкубація з лектином RCA, міченим пероксидазою хрому, візуалізація в системі діамінобензидин-Н₂O₂, б – негативний контроль: мазки оброблені 0,5 М моногідратом D-галактози, інгібітором лектину RCA. Цифрові позначення інтенсивності пероксидазної реакції: 0 – негативна реакція; 1 – слабка позитивна реакція; 2 – помірна позитивна реакція, 3 – сильна позитивна реакція. Збільшення × 1200. Bar = 10 мкм

вплив супроводжується динамічною перебудовою актинового цитоскелета, активацією тирозинкіназних шляхів, підвищенням фосфорилування кінази фокальних контактів (ФАК) з наступною асоціацією із PI-3'-кіназою. Міжмолекулярні взаємодії, опосередковані β,D-галактозовмісними компонентами поверхні НГ, активують тирозинкіназний шлях трансдукції клітинних сигналів, індукують ФАК та активують PI-3'-кіназу. Через галактозовмісні глікопротеїни регулюється міграція лейкоцитів під час запального процесу [13, 15, 27].

У наших попередніх дослідженнях встановлено [3, 31], що при діабеті процес (α2→6)-сіалювання лейкоцитарних гліканів

стає домінуючим, оскільки поверхневі глікокон'югати нейтрофілів характеризуються збільшенням місць зв'язування для лектину бузини чорної (SNA – специфічний до послідовності NeuNAc(α2→6)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому NeuNAc(α2→3)DGal/DgalNAc послідовності в олігосахаридах) та зменшенням сайтів зв'язування для лектину акації амурської (MAA – афінний до послідовності NeuNAc(α2→3)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому дисахаридних фрагментів, приєднаних (α2→6) глікозидним зв'язком). Тому виявлене нами зменшення інтенсивності лектиноцитохімічного забарвлення зовнішніх мембран НГ за умов ЦД 1-го типу при застосуванні лектину RCA може

Таблиця 2. Ступінь зв'язування лектину RCA з вуглеводними детермінантами поверхневих глікокон'югатів поліморфноядерних лейкоцитів крові хворих на цукровий діабет 1-го типу (M±m; n = 18–21)

Групи обстежених	Кількість нейтрофільних гранулоцитів з негативною і позитивною пероксидазною реакцією			
	негативна реакція (0)	слабка позитивна реакція (1)	помірна позитивна реакція (2)	сильна позитивна реакція (3)
Здорові донори	0,67 ± 0,36	238,25 ± 6,75	154,92 ± 4,97	5,33 ± 1,12
Цукровий діабет	153,70 ± 5,47*	229,80 ± 8,83	7,80 ± 1,73*	–

*P<0,01 – порівняно з контролем.

бути пояснене інтенсифікацією сіалювання вуглеводних залишків β ,D-Gal саме через (α 2 \rightarrow 6)-зв'язки.

Лектиноблотинг для виявлення галактозильних залишків у структурі глікопротеїнів різних фракцій лізатів поліморфноядерних лейкоцитів периферичної крові людей, хворих на цукровий діабет 1-го типу. Інтерпретацію результатів лектиноблотингу проводили зіставленням молекулярних мас RCA-позитивних глікопротеїнів і враховуючи літературні дані про ідентифіковані індивідуальні білки нейтрофільних гранулоцитів за допомогою моноклональних антитіл [18].

При застосуванні лектину RCA для дослідження мембранної фракції НГ виявлено загальне зниження лектинореактивності білкових смуг за ЦД 1-го типу щодо контролю

(див. рис. 2). Порівняно з мембранною фракцією НГ здорових донорів, глікопротеїни з M_w 78 та 55 кДа зовсім не виявлялись, а інтенсивність смуг з M_w 105, 90, 28 та 17 кДа суттєво знижується. У цитозольній фракції НГ не визначаються смуги з M_w 34 та 30 кДа, водночас помітно знижено інтенсивність смуги з M_w 22 кДа. Згідно з даними літератури, зафіксовані нами зміни можуть стосуватися низки функціонально важливих глікопротеїнів лейкоцитів [9, 11]. Глікопротеїни з молекулярними масами 90–105 кДа можуть бути β ₂-ланцюгами лейкоцитарних інтегринів LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), p150,95 (CD11c/CD18) та α D β ₂ (CD11d/CD18), які відрізняються за α -субодиницею [9, 11, 18]. Фосфорилування β ₂-субодиниці змінює функціональну активність молекули

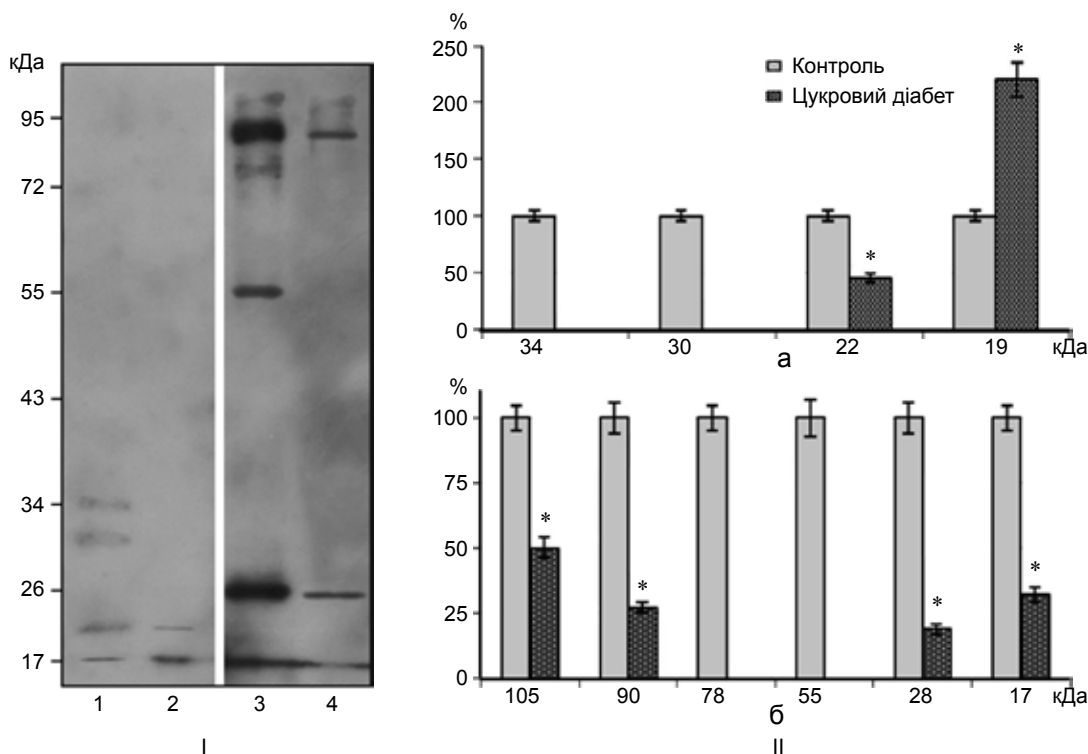


Рис. 2. Лектиноблотинг лейкоцитарних глікопротеїнів, що специфічно зв'язують лектин рицини (RCA), (I). Цитоплазматична фракція: 1 – контроль; 2 – цукровий діабет (ЦД) 1-го типу. Мембранна фракція: 3 – контроль; 4 – ЦД 1-го типу. Оцифровані результати специфічного зв'язування RCA-асоційованих глікопротеїнів лізатів нейтрофільних гранулоцитів, (II): а – цитозольна фракція, б – мембранна фракція. * $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Примітка. Після проведення денситометричного аналізу результатів лектиноблотингу за допомогою програми Gelpro32 вміст кожного окремого білка у контролі було прийнято за 100%. За умов ЦД 1-го типу лектинасоційовані глікопротеїни перераховувалися у відсотках відносно відповідних контрольних білків

інтегрину в цілому. Ці молекули залучаються у формування гомо- та гетеротипових клітинних взаємодій, зокрема, у процесах адгезії до ендотелію судин та агрегації клітин крові, активації фагоцитозу та кисневого вибуху. Глікопротеїни з молекулярною масою 52–55 кДа можуть відповідати CD14 та CD88. Молекула CD14 виявляється на активованих НГ і є рецептором до ліпополісахариду. Через CD14 відбувається трансмембранна передача сигналу з глікозилфосфатидилінозитолу на рецептор TLR-4 (від англ. TLR – Toll-like receptor 4). У нейтрофілах через рецептор TLR-4 передається сигнал на PI-3'-кіназу, яка задіяна у регуляції фагоцитарної активності цих клітин крові та реалізації ними респіраторного вибуху [32]. Глікопротеїн CD88 – важливий рецептор, що зв'язується з компонентом C5a системи комплементу і задіяний у процесі хемотаксису та секреторній функції НГ. Імовірно, що цитоплазматичні глікопротеїни з молекулярними масами 34, 30, 22 кДа відповідають азуроцидину, еластазі та катепсину G, функція яких пов'язана з бактерицидною та фагоцитарною активністю лейкоцитів.

Виявлене нами зменшення інтенсивності лектинореактивної смуги, яка свідчить про експонування інтегрину p150,95 (CD11c/CD18), може бути причиною зниження показників агрегації за наявності лектину RCA, оскільки відомо, що активація агрегації НГ відбувається за допомогою приєднання C3b-компонента комплементу до вказаного рецептора [12]. Не виключено також, що пригнічення бактерицидної активності нейтрофілів за умов ЦД 1-го типу, встановлене нами раніше [2], пов'язане зі зниженням вмісту катепсину G, азуроцидину, лейкоцитарної еластази та рецептора CD88 [10, 18, 24], молекулярні маси яких відповідають виявленим і проаналізованим лектинореактивним бендам. Подальша ідентифікація білків, що взаємодіють з лектином RCA, допоможе з'ясувати механізми порушення морфофункціонального стану НГ за умов ЦД 1-го типу.

Роль PI-3'-кіназного шляху в передачі RCA-індукованого сигналу через галактозилумісні глікопротеїни мембран поліморфноядерних лейкоцитів при ЦД 1-го типу. При активації PI-3'-кіназного сигнального шляху задіяний рецепторний апарат клітин та молекули адгезії. За умов ЦД 1-го типу перерозподіляються вуглеводні детермінанти у структурі глікокон'югатів мембран лейкоцитів периферичної крові, що у свою чергу призводить до модифікації міжклітинного впізнавання, порушення імунної відповіді, агрегаційної й адгезивної здатності цих клітин. Дослідження впливу селективного неконкурентного інгібітора PI-3'-кінази вортманіну на агрегаційну здатність НГ дає можливість з'ясувати роль PI-3'-кінази в організації міжклітинних молекулярних взаємодій і дослідити їхній характер за умов ЦД 1-го типу.

Після інкубації НГ із вортманіном проводили RCA-індуковану агрегацію цих клітин. У всіх досліджуваних зразках спостерігалася схожа тенденція – зниження агрегаційної здатності нейтрофільних лейкоцитів після дії вортманіну на ці клітини (див. табл. 1). У здорових донорів нейтрофіли, преінкубовані з вортманіном, втрачали здатність до RCA-індукованої агрегації в середньому в 2,2 раза. При цьому преінкубація з вортманіном НГ крові людей, хворих на ЦД, менш виразно знижувала показники RCA-індукованої агрегації цих клітин (у середньому в 1,5 раза), ніж у здорових донорів (див. табл. 1). Таким чином, показано інгібуючий вплив вортманіну на агрегацію нейтрофілів, стимульовану лектином RCA як у нормі, так і за умов ЦД 1-го типу.

Виявлене різке зниження лектиніндукованої агрегаційної здатності поліморфноядерних лейкоцитів за умов преінкубації клітин з вортманіном незаперечно свідчить про активну участь цього ензиму в перегрупуванні рецепторного апарату на поверхні клітин крові та у реалізації лейкоцитарних взаємодій як у нормі, так і при ЦД 1-го типу

[3, 4, 25]. Тому важливим було з'ясувати динаміку транслокації $p85\alpha$ -субодиниці між мембранною та цитозольною фракціями у разі трансдукції сигналу, викликаного зв'язуванням галактозоспецифічного лектину з вуглеводними детермінантами глікокон'югатів мембрани лейкоцитів.

Методом імуноблотингу було встановлено, що у поліморфноядерних лейкоцитах здорових донорів 20 % $p85\alpha$ -субодиниці детектувалося у цитозольній фракції, а 80 % – у мембранній (рис. 3). Динаміка формування клітинної відповіді через PI-3'-кіназний сигнальний шлях на індукуючий вплив лектину RCA була наступною. Вміст $p85\alpha$ -субодиниці перерозподілявся між мембранною та цитозольною фракціями НГ здорових донорів у такому співвідношенні: після 30 с впливу цього лектину він достовірно не змінювався, але виявляв тенденцію до зменшення у

цитозолі і до збільшення у цитоскелеті (див. рис. 3); після однохвилинної інкубації з RCA у цитозольній фракції він збільшився до 80 %, а у мембранній – зменшився до 20 %. На 2-гу та 15-ту хвилину впливу лектину RCA $p85\alpha$ -субодиниця перерозподілялася між цитозолем і мембранною у співвідношенні 70–65 % до 30–35 % (див. рис. 3). Таким чином, за умов довготривалої лектиніндукованої стимуляції НГ здорових донорів вона практично переміщлася у цитозольну фракцію.

У лізатах НГ людей, хворих на ЦД 1-го типу, регуляторна субодиниця була локалізована в основному в цитозольній фракції. Преінкубація НГ з лектином RCA протягом 30 с не впливала на перерозподіл $p85\alpha$ -субодиниці, яка так і залишалася у цитозольній фракції, а вже на 1-шу хвилину впливу спостерігалось поступове її переміщення з цитозолу у цитоскелет, асоційований з

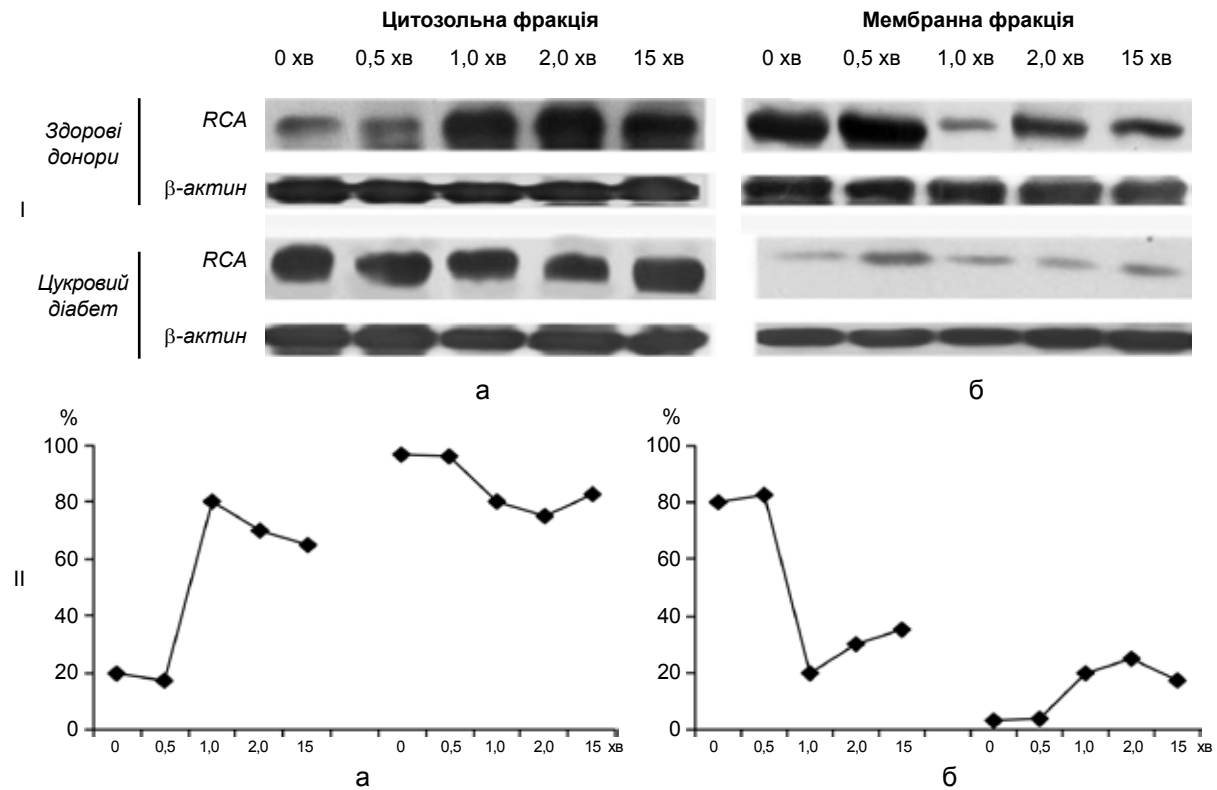


Рис. 3. Імуноблотинг білків з використанням антитіл до $p85\alpha$ регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (I). Динаміка вмісту $p85\alpha$ -субодиниці у цитозольній і мембранній фракціях нейтрофільних гранулоцитів крові здорових донорів і людей, хворих на цукровий діабет 1-го типу після RCA-індукованого впливу (II): а – цитозольна фракція, б – мембранна фракція

мембраною (див. рис. 3). При діабеті на 2-гу хвилину інкубації клітин з лектином RCA виявлено максимальний вміст р85 α -субодиниці у мембранній фракції, який збільшився з 3 до 25 % (див. рис. 3), а на 15-ту хвилину впливу лектину вона знову поступово транслокувалася назад у цитозольну фракцію.

За умов ЦД 1-го типу клітинна відповідь, пов'язана із транслокацією р85 α -субодиниці після RCA-індукованого впливу на нейтрофіли, відрізнялася за своєю інтенсивністю й формуванням у часі від здорових донорів, що може бути пов'язане зі зміною кількості або структури плазматичних глікопротеїнових рецепторів, які містять термінальні залишки галактози.

У хворих на ЦД відбувається преактивація НГ, що виражається у передчасній дегрануляції цих клітин [14]. Участь PI-3'-кінази у молекулярних механізмах, що опосередковують зміну морфофункціонального стану нейтрофілів при ЦД, підтверджується то-

тальною транслокацією р85 α -субодиниці із мембранної фракції у цитозольну, вміст якої у цитозолі сягав 95 %, що у 4,5 раза більше, ніж у нормі (див. рис. 3, 4). Є дані про те, що в поліморфноядерних нейтрофілах PI-3'-кіназа частково локалізується в цитоплазматичних ліпідних тільцях [33]. У нейтрофілах вона бере участь у проведенні клітинної відповіді з мембран внутрішньоклітинних гранул, в тому числі і з доменів ліпідних тілець, а, отже, може бути задіяна у процесі передчасної дегрануляції цих клітин, що є етіологічною основою багатьох ускладнень за умов діабету [4, 5].

На рис. 4 представлені результати, за якими можна охарактеризувати вплив вортманіну на процес транслокації р85 α -субодиниці. У поліморфноядерних лейкоцитах здорових донорів пік формування проходження PI-3'-кіназоалежного сигналу за дії лектину RCA, який ми реєструємо за вмістом мембранозв'язаної регуляторної субодиниці

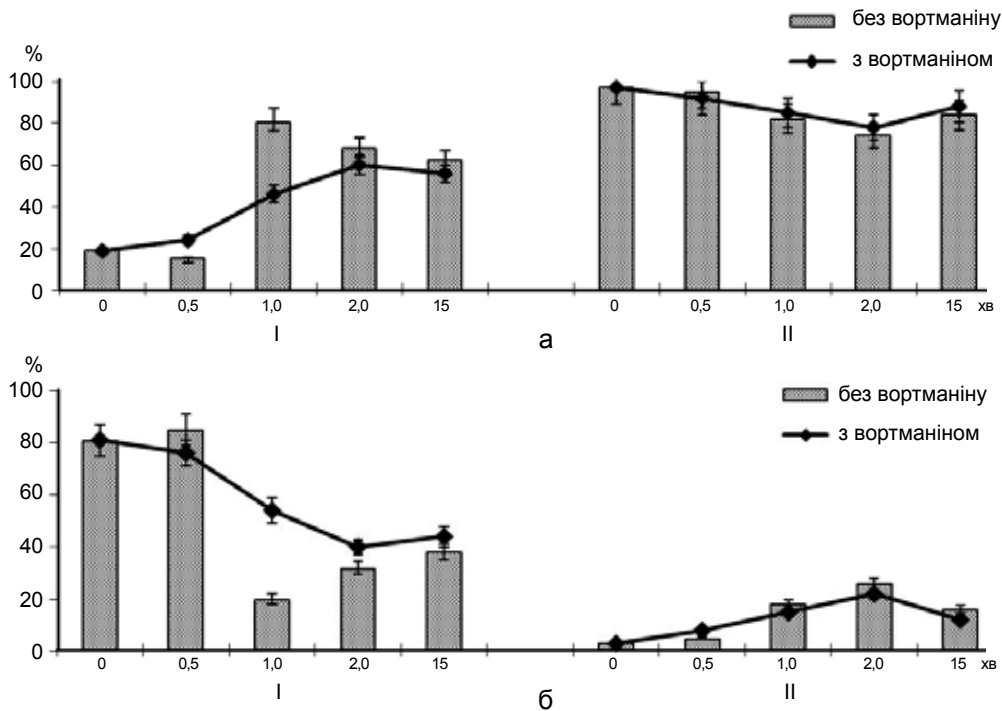


Рис. 4. Вплив вортманіну на динаміку вмісту р85 α -субодиниці ензиму PI-3'-кінази у цитозольній (а) та мембранній (б) фракціях нейтрофільних гранулоцитів крові здорових людей (I) і хворих на цукровий діабет 1-го типу (II) після RCA-індукованого впливу

цього ензиму, відзначається вже після 30 с впливу. Тоді як за умов діабету цей процес сповільнено до 2-ї хвилини і він значно пригнічений за своєю амплітудою. Експериментальні результати можуть свідчити про те, що у разі стимуляції поліморфноядерних лейкоцитів здорових людей галактозоспецифічним лектином протягом 1 хв субодинаця р85 α транслокується з мембранної фракції у цитозоль, але цей процес пригнічується вортманіном.

За дії вортманіну при ЦД 1-го типу незначно зменшувався ступінь, але не характер транслокації досліджуваної субодинаці із мембранної фракції у цитозольну у відповідь на індукуючий вплив галактозоспецифічного лектину. За умов діабету НГ є преактивованими ще до початку дії рицинового сигналу. Основна частина регуляторної р85 α -субодинаці знаходиться не у мембрані, а в середині клітини. В цитозолі вона утворює комплекси з фосфорильованими протеїнами внутрішньоклітинних гранул та об'єднується з каталітичною субодинацею PI-3'-кінази [33]. Асоціація та активація субодинаць ліпофільного ензиму PI-3'-кінази ініціює сповільнену клітинну відповідь, що супроводжується дегрануляцією нейтрофілів.

ВИСНОВКИ

1. У результаті проведеної RCA-індукованої агрегації, лектиноцитохімічного аналізу та лектиноблотингу підтверджено пришвидшену диференціацію та старіння нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові за умов ЦД 1-го типу. При досліджуваній патології зниження агрегаційної здатності нейтрофільних гранулоцитів у разі використання RCA вказує на зменшення рівня експонування на поверхні поліморфноядерних лейкоцитів β ,D-галактозовмісних глікокон'югатів.

2. PI-3'-кіназозалежні сигнальні мережі задіяні в сприйнятті та передачі сигналів через галактозовмісні глікопротеїнові рецептори в середину нейтрофільних лейкоцитів.

3. Перерозподіл кількості та зміни у структурі глікопротеїнових рецепторів мембран лейкоцитів зумовлюють метаболічні порушення на рівні клітини, що може бути етіологічною передумовою діабетичних ускладнень і розвитку хронічних захворювань, що погіршують стан хворих на ЦД 1-го типу.

Дослідження були підтримані грантом УНТЦ / STCU (Науково-технологічним Центром України / SCIENCE and TECHNOLOGY CENTER in UKRAINE) № 4281 "Розробка тест-системи для дослідження молекулярних механізмів агрегаційної здатності лейкоцитів за умов діабету", 2008–2010 рр.

Н.А. Сибирная, И.В. Бродяк, М.Л. Барская, Е.И. Вовк

УЧАСТИЕ ЭНЗИМА ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-3'-КИНАЗЫ В ВОСПРИЯТИИ И ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛОВ ЧЕРЕЗ ГАЛАКТОЗИЛСОДЕРЖАЩИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ СЕГМЕНТОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

Показано, что снижение содержания β ,D-галактозилсодержащих углеводных детерминант гликоконъюгатов на плазматической мембране сегментоядерных нейтрофилов периферической крови при сахарном диабете 1-го типа коррелирует с изменениями агрегационной способности этих клеток и может нарушать их функциональное состояние. Изменения показателей ридининдуцированной активации нейтрофилов после ингибирования энзима фосфатидилинозитол-3'-киназы (PI-3'-киназы) вортманнином указывает на то, что функциональное состояние полиморфноядерных лейкоцитов опосредуется сигнальными путями, в которые вовлечена PI-3'-киназа. Таким образом, PI-3'-киназозависимые сигнальные сети задействованы в процессах восприятия и передачи сигналов через галактозилсодержащие гликопротеиновые рецепторы вовнутрь нейтрофильных лейкоцитов. Инертность интенсивности формирования во времени клеточного ответа нейтрофильных гранулоцитов на RCA-индуцированную транслокацию р85 α -регуляторной субодинацы PI-3'-киназы из цитозольной в мембранную фракцию при сахарном диабете 1-го типа является следствием изменения количества или структуры плазматических галактозилсодержащих гликопротеиновых рецепторов. Выявленные изменения могут быть этиологической предпосылкой диабетических осложнений и развития хронических заболеваний, которые ухудшают состояние

больных сахарным диабетом 1-го типа.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, β ,D-галактозилсодержащие углеводные детерминанты гликоконъюгатов, PI-3'-киназа, вортманнин, сахарный диабет 1 типа.

N.O. Sybirna, I.V. Brodyak, M.L. Bars'ka, O.I. Vovk

PARTICIPATION OF PHOSPHATIDYLINOSITOL-3'-KINASE IN SIGNAL TRANSDUCTION THROUGH GALACTOSYL-CONTAINING GLYCOPROTEIN RECEPTORS OF SEGMENTONUCLEAR LEUKOCYTES UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

It is shown that reduction of β ,D-galactosyl-containing carbohydrate determinants of glycoconjugates on the plasmatic membrane of segmentonuclear neutrophils of peripheral blood under type 1 diabetes mellitus (DM) is correlated with changes in aggregation of these cells and may cause their functional disorder. Changes in the parameters of ricin-induced neutrophil activation after inhibition of the phosphatidylinositol-3'-kinase (PI-3'-kinase) enzyme with wortmannin indicated that the functional state of polymorphonuclear leukocytes is mediated by signaling pathways in which PI-3'-kinase is involved. Thus, PI-3'-kinase-dependent signal networks are involved in the processes of signal transduction through galactosyl-containing glycoprotein receptors into neutrophilic leukocytes. Inertness of the intensity formation in time of neutrophil granulocyte cell response on RCA-induced translocation of the p85 α regulatory subunit of PI-3'-kinase from the cytosolic to the membrane fraction under type 1 DM is a consequence of changes in the number or structure of plasmatic galactosyl-containing glycoprotein receptors. The revealed changes may be etiologic premise of diabetic complications and chronic diseases that impair the functional condition of patients with type 1 DM. Key words: neutrophil granulocytes, β ,D-galactosyl-containing carbohydrate determinants of glycoconjugates, PI-3'-kinase, wortmannin, type 1 diabetes mellitus.

Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine; Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів: Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького, 2005. – 554 с.
2. Бродяк І.В., Барська М.Л., Сибірна Н.О. Апоптоз імункомпетентних клітин крові при цукровому діабеті 1 типу // Лаб. діагностика. – 2005. – № 2. – С. 22–25.
3. Здіорук М.І., Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Участь PI-3'-кіназного сигнального шляху у визначенні структурно-функціонального стану мембран лейкоцитів за умов

цукрового діабету 1 типу // Біол. студії. – 2011. – 5, № 1. – С. 85–96.

4. Сибірна Н.О., Здіорук М.І., Бродяк І.В., Барська М.Л., Вовк О.І. Активация фосфатидилинозитол-3'-кіназного шляху лектиніндукованим сигналом через сіаловмісні глікопротеїни мембран лейкоцитів у здорових донорів та за умов цукрового діабету 1 типу // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, № 5. – С. 22–31.
5. Alba-Loureiro T.C., Munhoz C.D., Martins J.O., Cerehio G.A., Scavone C., Curi R. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus // Brazil. J. Med. and Biol. Res. – 2007. – 40. – P. 1037–1044.
6. Aleksandrovski Ya.A. Molecular mechanisms of the cross-impact of pathological processes in a combined diabetes and cancer condition. Research and clinical aspects // Biochemistry. – 2002. – 67, № 12. – P. 1611–31.
7. Alon R., Ley K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells // Curr. Opin. Cell Biol. – 2008. – 20. – P. 525–536.
8. Alon R., Rosen S. Rolling on N-linked glycans: a new way to present L-selectin binding sites // Nat. Immunol. – 2007. – 8. – P. 339–350.
9. Anderson G. J., Roswit W.T., Holtzman M.J., Hogg J.C., Van Eeden S.F. Effect of mechanical deformation of neutrophils on their CD18/ICAM-1-dependent adhesion // J. App. Physiol. – 2001. – 91. – P. 1084–90.
10. Avril T., Freeman S., Attrill H., Clarke R. G., Crocker P. R. Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation // J. Biol. Chem. – 2005. – 280. – P. 19843–19851.
11. Cabec V., Carreno S., Moisan A., Bordier C., Maridonneau-Parini I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively // J. Immunol. – 2002. – 169, № 4. – P. 2003–2009.
12. Chang Y.C., Chan Y.H., Jackson D.G., Hsieh S.L. The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion // Ibid. – 2006. – 176, № 1. – P. 173–80.
13. Crocker P.R. Siglecs in innate immunity // Curr. Opin. Pharmacol. – 2005. – 5. – P. 431–437.
14. Dodd R.B., Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity // Glycobiology. – 2001. – 11. – P. 71R–79R.
15. Fernández-Rodríguez J., Feijoo-Camero C., Merino-Trigo A., Páez de la Cadena M., Rodríguez-Berrocal F. J., de Carlos A., Butrón M., Martínez-Zorzano V.S. Immunohistochemical analysis of sialic acid and fucose composition in human colorectal adenocarcinoma // Tumor Biol. – 2000. – 21, № 3. – P. 153–164.
16. Fujita T., Matsushita M., Endo Y. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution // Immunol. Rev. – 2004. – 198. – P.185–202.
17. Fukuda M. Cell surface carbohydrates and cell development. – Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992. – 329 p.

18. Graham S.A., Antonopoulos A., Hitchen P.G., Haslam S.M., Dell A., Drickamer K., Taylor M.E. Identification of neutrophil granule glycoproteins as lewisx-containing ligands cleared by the scavenger receptor C-type lectin // *J. Biol. Chem.* – 2011. – **286**, № 27. – P. 24336–24349.
19. Hossler P., Khattak S., Jian Li Z. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture // *Glycobiology.* – 2009. – **19**. – № 9. – P. 936–949.
20. Kaneider N.C., Leger A.J., Kuliopulos A. Therapeutic targeting of molecules involved in leukocyte-endothelial cell interactions // *FEBS J.* – 2006. – 273. – P. 4416–4424.
21. Kopff M., Zakrzewska I., Klem I. *Acta Biochimica Polonica.* – 1997. – **44**, № 2. – P. 359–362.
22. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
23. Lutsik A. D., Detjuk E.S., Lutsik M.D. *Lectins in Histochemistry.* – Lvov: Lvov Univ. Publish. House. – 1989. – 144 p.
24. Mantovani A., Bussolino F., Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside // *Immunol. Today.* – 1997. – № 18. – P. 231–240.
25. Okada T., Sakuma L., Fukui Y., Hazeki O. Ui M. 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. – P. 3563–3567.
26. Pan-Jun Kim, Dong-Yup Lee, Hawoong Jeong. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells // *PLoS ONE.* – 2009. – **4**, № 10. – P. e7317.
27. Piccardoni P., Sideri R., Manarini S., Piccoli A., Martelli N., Gaetano G., Cerletti C., Evangelista V. Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin // *Blood.* – 2001. – **98**, № 1. – P. 108–116.
28. Rudiger H., Gabius H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications // *Glycoconj J.* – 2001. – **18**. – P. 589–613.
29. Sharon N., Lis H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology.* – 2004. – **14**. – P. 53R–62R.
30. Sybirna N., Barska M., Brodyak I., Vovk O., Drobot L. Study of carbohydrate determinants of leukocyte glycoprotein receptors in patients with type 1 diabetes mellitus // *Ann. Univer. Mariae Curie-Skłodowska.* – Lublin (Poland). – 2006. – **19**, № 1 (46). – P. 215–218.
31. Sybirna N., Brodyak I., Zdioruk M., Barska M. Sialic acid-containing glycoproteins are the marker molecules that determine the leukocyte functional state under diabetes mellitus // *Sepsis.* – 2011. – **4**, № 1. – P. 47–55.
32. Weichhart T., Saemann M.D. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – **67**, Suppl III. – P. 70–74.
33. Wengui Yu., Cassara J., Weller P.F. Phosphatidylinositol 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells // *Blood.* – 2000. – **95**, № 3. – P. 1078–1085.
34. William A. Muller. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response // *TRENDS in Immunol.* – 2003. – **24**, № 6. – P. 326–333.
35. Yarema K. J., Bertozzi K. R. Characterizing glycosylation pathways // *Genome Biol.* – 2011. – **2**, № 5. – P. 0004.1–0004.10.
36. Zarbock A., Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium // *Amer. J. Pathol.* – 2008. – 172. – P. 10–21.

Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка;
 Ін-т біології клітини НАН України, Львів
 E-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Матеріал надійшов
 до редакції 08.06.2012