

РОЛЬ ФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛ-3-КИНАЗИ В РЕГУЛЯЦІЇ АГРЕГАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ ТРОМБОЦИТІВ ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-го ТИПУ

Н. О. СИБІРНА¹, О. І. ВОВК², М. М. ВЕЛИКИЙ³

¹Львівський національний університет імені Івана Франка;

²Інститут біології клітини НАН України, Львів;

³Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Україна, Київ;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Показано, що інкубація обогаченої тромбоцитами плазми крові здорових донорів с селективним неконкурентним інгібітором фосфатидилінозитол-3-киназы вортманином викликає різке зниження агрегаційної здатності кров'яних пластинок, тоді як в плазмі хворих на цукровий діабет 1-го типу цей ефект або значно нижче, або взагалі не спостерігається. Ними було досліджено динаміку транслокації в цитоскелетну фракцію тромбоцитів регуляторної суб'єдиниці фермента — p85 α — при індукції агрегації цих формених елементів крові АДФ в різних концентраціях і при впливі вортманином. Проаналізовані також взаємодії ендотеліальної конститутивної NO-синтази і фосфатидилінозитол-3-киназы в механізмі регуляції функціонального стану тромбоцитів при патології і в нормі.

Ключові слова: фосфатидилінозитол-3-киназа, тромбоцити, агрегація, цукровий діабет 1-го типу.

За цукрового діабету 1-го типу у хворих порушується функціональний і морфологічний стан тромбоцитів: змінюються розміри та кількість старих форм у кровотоці, чутливість до агоністів агрегації, посилюються адгезивні властивості та скорочується тривалість життя. За цих умов у плазмі крові підвищується концентрація тромбоцитарних факторів і агрегованих тромбоцитів [1,2]. Такий стан організму асоціюється з високим ризиком тромбоемболічних ускладнень. За розвитку діабетичних порушень значно активується агрегаційна функція тромбоцитів, що дає привід розглядати гіперагрегацію як одну з можливих етіологічних причин ангіопатій.

Детальну інформацію щодо особливостей функціонування тромбоцитів можна одержати, вивчаючи їхню агрегаційну здатність. Дослідження її під впливом таких слабких агентів, як АДФ, адреналін і серотонін у низьких дозах, дозволяє оцінити процеси первинної агрегації тромбоцитів, які здійснюються за дії екзогенних індукторів, а також у разі порушення цього процесу внаслідок участі в ньому дефектних чинників (рецепторів мембрани, що реагують на фактор активації; рецепторів плазматичного фібриногену; комплексів глікопротеїнів (GP IIb-IIIa)) та за наявності в навколишньому середовищі іонів Са і фібриногену. Дослідження процесів агрегації, зумовлених слабкими індукторами у великих концентраціях та сильними агоністами (тромбіном, колаге-

ном), дає можливість визначити сумарну секрецію тромбоцитів, тобто реакцію вивільнення з них гранул.

Оксид азоту (NO) як сильний дезагрегаційний агент відіграє важливу роль у регуляції коагуляції крові та тромбоутворення. Розвиток багатьох патологій, в т.ч. і досліджуваної нами, пов'язаний з гіпер- або гіпопродукцією оксиду азоту, який утворюється за участю різних ізоформ NO-синтази (NOS, КФ:1.14.13.19). У тромбоцитах функціонують Са²⁺-залежна конститутивна ендотеліальна (eNOS III) та індукційна (iNOS II) NO-синтази [3]. У разі контакту тромбоцитів з пошкодженими судинами або за наявності в середовищі біологічно активних речовин інтенсифікується дія eNOS. Це зумовлює синтез ендотеліального фактора релаксації — ендогенного оксиду азоту. Його вплив на агрегаційну здатність тромбоцитів здійснюється шляхом активації розчинної гуанілатциклази за гемозалежним механізмом. Унаслідок збільшення активності ферменту підвищується вміст cGMP у тромбоцитах, що супроводжується активацією cGMP-залежної протеїнкінази. До ефектів цієї серин/треонін кінази належить інгібування протеїнкінази С інозитолфосфатного шляху, чим зумовлюється різке збільшення екстрацелюлярної концентрації іонів Са на тлі зниження її у кров'яних пластинках, що, власне, і є сигналом до їхньої дезагрегації [4]. Локалізація ендотеліальної NO-синтази (eNOS)

у плазматичній мембрані як у розчинній, так і у мембранозв'язаній формі, ймовірно, має істотне значення для механізмів трансдукції сигналу за участю NO, чим опосередковується здійснення основних функцій тромбоцитів і вплив на їхній морфофункціональний стан. Сигнальний шлях, який забезпечує вияв дезагрегуючого ефекту NO в нормі та за патологічних умов, ще вивчено недостатньо.

Із досліджень останніх років стає все очевиднішим, що клітинні сигнальні мережі, в яких задіяно протеїнкіназу С, перетинаються в багатьох випадках із сигнальними шляхами, залежними від функціонування ферменту фосфатидилінозитол-3-кінази (PI-3-кінази, КФ: 2.7.1.137) [4] — одного з найважливіших регуляторних білків, який міститься на перехресті численних шляхів сигналізації і контролює ключові функції клітини [5]. Цей фермент, взаємодіючи з інтегриновими рецепторами, бере участь у передачі сигналу як у клітині, так і в міжклітинному просторі. Стимуляція тромбоцитів, у значній мірі, є наслідком активації і транслокації ферменту в цитоскелет кров'яних пластинок: у сайти, які опосередковують інтегринозалежну фокальну адгезію [6,7]. PI-3-кіназа виконує важливу функцію в реорганізації цитоскелета, що супроводжується необоротною агрегацією та ретракцією кров'яного згустка [8].

Отже, морфофункціональний стан тромбоцитів людини тісно пов'язаний з функціонуванням як NOS, що продукує фактор дезагрегації NO, так і з PI-3-кіназою, яка сприяє процесам необоротного злипання кров'яних пластинок. Такий різноспрямований вплив на останні важливо враховувати при дослідженні патологічного стану, ускладнення якого спричинюється зміною функціональних властивостей тромбоцитів, тобто за умов цукрового діабету 1-го типу.

Метою роботи було дослідження впливу селективного неконкурентного інгібітора PI-3-кінази — вортманіну — на агрегаційну здатність тромбоцитів і рівень стабільних метаболітів NO ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) у здорових донорів та хворих на цукровий діабет 1-го типу, а також вивчення динаміки транслокації в цитоскелетну фракцію регуляторної субодиниці $\text{p85}\alpha$ PI-3-кінази за індукції агрегації кров'яних пластинок вортманіном та ADP в різних концентраціях.

Матеріали і методи

В експериментах як зразки використовували кров 8 здорових донорів контрольної групи (2 жінки та 6 чоловіків віком 34 ± 9 років) і 10 хворих на цукровий діабет 1-го типу (3 жінки та 7 чоловіків віком 35 ± 7 років, тривалість захво-

рування від 7 до 15 років із клінічно констатованими ангіопатіями). Хворі отримували інсулін («NovoNordisk», Данія), однак не вживали ліки, які б впливали на функцію тромбоцитів, упродовж двох тижнів перед дослідженнями. Рівень глюкози в контрольних та діабетичних донорів становив $5,1 \pm 0,4$ та $8,2 \pm 0,8$ ммоль/л відповідно, а глікозильованого гемоглобіну (HbA_{1c}) — $7,9 \pm 0,9\%$.

Зразки крові брали вранці (натщесерце, до прийому інсуліну) у силіконізовані пробірки, що містили 0,1 об'єму 3,8%-го розчину антикоагулянту — цитрату натрію — і 1,5 МО/мл апірази («Sigma grade V», США). Для одержання збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) кров центрифугували при кімнатній температурі (10 хв, 500 г). Частину цієї плазми інкубували з вортманіном (кінцева концентрація 100 нМ) протягом 30 хв при кімнатній температурі за постійного перемішування. Дослідження агрегаційної здатності тромбоцитів здійснювали у збагаченій ними плазмі з використанням лазерного аналізатора «Біола» (Росія) за таких умов: температура — 37°C , швидкість перемішування — 800 об/хв, концентрація клітин у пробі — 200 тис/мкл, індуктор агрегації — 5 мкМ ADP.

Решту плазми переносили в іншу силіконізовану пробірку і після підкислювання цитратом до рН 6,5 центрифугували (20 хв, 4000 г) для осадження тромбоцитів. Останні двічі промивали у 100 об'ємах середовища, що містило 137 мМ NaCl, 11 мМ глюкози, 11 мМ цитрату Na (рН 6,5), 0,25% бичачого сироваткового альбуміну («Sigma», фракція IV, вільна від вмісту жирних кислот) та 0,2 МО/мл апірази [9]. Відмиті тромбоцити ресуспендували в середовищі такого складу (в мМ): NaCl — 137, KCl — 2, MgCl_2 — 1, CaCl_2 — 1, NaH_2PO_4 — 0,4, глюкози — 5,6, hepes (N-2-гідроксіетилпіперазин-N'-2-етансульфонат) — 5, в яке вносили 1 МО/мл апірази (рН 7,4) [9]. Тромбоцити інкубували з ADP в різній концентрації (0,5; 1,0 і 5,0 мкМ) при 37°C і швидкості перемішування 800 об/хв. Процес зупиняли через 2 хв додаванням до середовища холодного двократного буфера лізису. Лізис тромбоцитів здійснювали протягом 30 хв на льодяній бані буфером, який містив 10 мМ трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1% тритону X-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ NaF, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду («Fluka», Швейцарія), 5 мМ бензамідину («Sigma», США), 10 мкг/мл апротиніну («Sigma»), 10 мкг/мл лейпептину («Sigma»), 2 мкг/мл пепстатину («Fluka») і 0,25 мМ Na_3VO_4 . Детергентнерозчинну фракцію осаджували центрифугуванням (12 000 об/хв, 4°C , 15 хв). Концентрацію білка в супернатантах визначали методом G. L. Peterson

[10]. Білки розділяли шляхом електрофорезу у блоках градієнтного (5–18%) поліакриламідного гелю в буферній системі Laemmli за наявності Ds-Na [11] і переносили на полівінілдіфторидну мембрану («Whatman», Велика Британія) в буфері, що містив 20,0 мМ трис, 192,5 мМ Gly, 20,0% метанолу, 0,1% Ds-Na (рН 8,3) [11] протягом 2 год при 250 мА [12]. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували 5%-м сухим знежиреним молоком в забуференому фізіологічному розчині (137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 4,3 мМ Na₂HPO₄; 1,7 мМ KH₂PO₄; рН 7,3), до якого вносили 0,1% твін-20. Детекцію p85α – регуляторної субодиниці PI-3-кінази – здійснювали на блятах, використовуючи моноклональні анти-p85α антитіла, люб'язно надані докт. І. Гуттом (Людвігівський інститут ракових досліджень, Велика Британія). Як другі антитіла використовували антимишачі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрину («Sigma»). Імунореактивні плями виявляли за допомогою реагенту, який посилює хемілюмінесценцію («Amersham», Велика Британія). Денситометричний аналіз результатів імуноблотингу здійснювали з використанням пакета програми «Image Tool». Активність NO-синтази контролювали опосередковано за вмістом у тромбоцитах кінцевих продуктів обміну NO: нітритів і нітратів методом Й. Грісса та П. Коза відповідно [13].

Результати та обговорення

Як впливає з результатів, наведених у таблиці, інкубація ЗТП з вортманіном у здорових донорів зумовлює різке зниження агрегаційної здатності кров'яних пластинок, тоді як у хворих на цукровий діабет 1-го типу цей ефект був значно меншим або взагалі не спостерігався. Тривалість агрегації при інкубації з вортманіном знижувалась як у контролі, так і за патології. Збільшення концентрації кінцевих продуктів метаболізму – нітритів та нітратів (NO₂⁻+NO₃⁻) – після інкубації ЗТП з вортманіном у здорових осіб свідчить про підвищення активності NO-синтази у тромбоцитах. Це узгоджується з даними літератури щодо рівня у тромбоцитах NO та cGMP за наяв-

ності в середовищі інкубації інгібіторів PI-3-кінази [14]. За цукрового діабету показник сумарної концентрації NO₂⁻+NO₃⁻, як і за присутності інгібітора, вірогідно не змінюється.

У нормі фізіологічний дезагрегаційний вплив на тромбоцити здійснюється NO, який продукується у клітині за участю eNOS [15]. Відомі дані про те, що PI-3-кінази притаманні досить складні взаємозв'язки із системою NO-синтази, які специфічні для кожної ізоформи [16,17]. Інкубація ЗТП з вортманіном перешкоджає взаємодії ферменту з інтегриновими рецепторами на поверхні тромбоцита під час трансдукції сигналу зсередини клітини назовні. Внаслідок цього не відбувається кластеризації інтегринових рецепторів типу GPIIb-IIIa, а здатність тромбоцитів до злипання різко знижується. Антиагрегаційну функцію NO здійснює, принаймні, двома шляхами: за активації гуанілатциклази і інгібування PI-3-кінази [4]. Отже, в нормі спостерігається адитивна дезагрегуювальна дія NO та вортманіну.

Показано, що гіперглікемія *in vitro* та *in vivo* (за цукрового діабету) підвищує реактивність тромбоцитів [18]. Гіперчутливість останніх при хронічній гіперглікемії можна частково пояснити зменшенням активності eNOS унаслідок глікозилювання кальмодуліну (одного з кофакторів NOS) [15]. Тривала гіперглікемія, стимулюючи поліоловий шлях обміну глюкози, призводить до вичерпання у клітинах глутатіону та NADPH. Останній є облігатним кофактором для NOS. Крім того, гіперглікемія провокує збільшення активності протеїнкінази C, яка інгібує активність eNOS шляхом фосфорилювання [19]. Кінцеві продукти глікозилювання знижують доступність NO або «гасять» його активність, що зумовлює гальмування фізіологічної антиагрегаційної функції оксиду азоту [20]. Розвиток генералізованої гіпоксії, характерної для цукрового діабету, спричинює зменшення активності eNOS [21]. Зниження рівня NO через зменшення активності цієї ізоформи ферменту не компенсується за підвищення активності індукцибельної NO-синтази (iNOS), активацію експресії якої у тромбоцитах

Зміни показників після інкубації з вортманіном ЗТП здорових донорів та хворих на цукровий діабет 1-го типу (M ± m, n = 8–10)

Умови досліджу	Ступінь агрегації, ум. од.	Час агрегації, с	NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ , мкМ
Контроль	23,9 ± 0,15	220 ± 20	18,87 ± 0,67
Контроль + вортманін	7,6 ± 0,44*	50 ± 4*	20,61 ± 0,45*
Діабет	53,8 ± 2,5*	54 ± 5*	24,37 ± 0,50*
Діабет + вортманін	48,1 ± 2,1	41 ± 8**	23,87 ± 0,87

*,** Дані вірогідні щодо здорових донорів та хворих на цукровий діабет 1-го типу, *p* < 0,05.

за цукрового діабету 1-го типу було встановлено в наших попередніх роботах [22], в них показано, що утворений за функціонування іNOS оксид азоту радикал-радикально взаємодіє з супероксиданіоном (O_2^-) – другим продуктом цього поліфункціонального ферменту. У разі активації PI-3-кінази інтенсифікується дія NADPH-оксидази, а, отже, збільшується пул O_2^- [14]. За взаємодії NO та O_2^- утворюється пероксинітрит – потужний оксидант. Таким чином, концентрація фізіологічного фактора дезагрегації NO у тромбоцитах за цукрового діабету знижується, а інгібувальна дія NO на PI-3-кіназу нівелюється, що також вносить певну частку у підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів хворих на діабет. Вортманін *in vitro* вірогідно не впливає на їхню здатність до злипання (таблиця), що свідчить про розбалансованість молекулярного механізму корекції функціонального стану кров'яних пластинок, яка спостерігається в контролі.

У наших попередніх дослідженнях [22] було показано, що при цукровому діабеті 1-го типу зростає експресія регуляторної субодиниці p85 α PI-3-кінази тромбоцитів. Це може бути однією із причин преактивації кров'яних пластинок під час хвороби і підвищення їхньої чутливості до агоністів агрегації. На рис. 1 (А, Б) наведено дані,

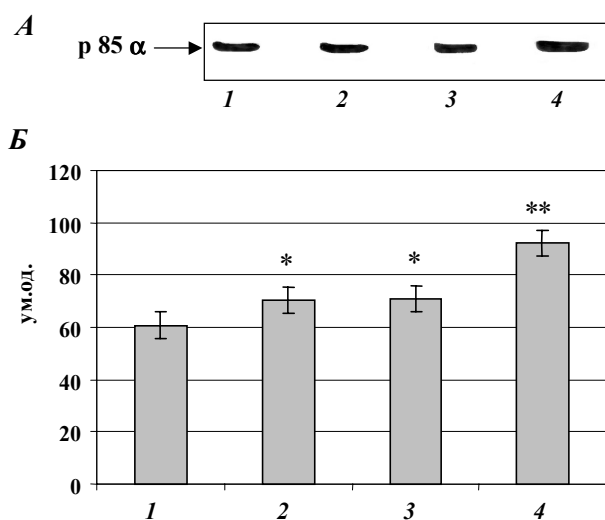


Рис. 1. Вплив вортманіну на рівень p85 α фракції тромбоцитів, розчинній у тритоні X-100: 1 – контроль, 2 – контроль + вортманін, 3 – цукровий діабет, 4 – цукровий діабет + вортманін, А – імуноблотинг p85 α ; Б – динаміка рівня p85 α у детергентрозчинній фракції тромбоцитів.

Тут і на рис. 2: * дані вірогідні порівняно зі здоровими донорами, $p < 0,05$; ** дані вірогідні порівняно з хворими на цукровий діабет 1-го типу.

які дозволяють проаналізувати вплив вортманіну на рівень p85 α в цитозольній фракції тромбоцитів здорових донорів та людей, хворих на цукровий діабет 1-го типу. За інкубації ЗТП з вортманіном у контролі збільшується рівень p85 α у цитозолі тромбоцитів, тобто інгібітор перешкоджає інкорпорації PI-3-кінази у цитоскелетну фракцію, що узгоджується зі зниженням агрегаційної здатності кров'яних пластинок. За патології інкубація останніх з вортманіном також спричинює підвищення вмісту p85 α в цитозольній фракції, яке, однак, не супроводжується зміною агрегаційної здатності цих формених елементів крові. Реакція тромбоцитів на присутність інгібітора ферменту за діабету є парадоксальною. На фоні зниження його інкорпорації в цитоскелетну фракцію агрегаційна здатність тромбоцитів залишається дуже високою.

На рис. 2 наведено результати імуноблот-аналізу p85 α тромбоцитів у здорових осіб (рис. 2, А, 2, Б – треки 1–4) та хворих на цукровий діабет 1-го типу (рис. 2А, 2Б – треки 5–8) після впливу *in vitro* на клітини різних концентрацій індуктора агрегації ADP. Досліджувані концентрації індуктора було вибрано так, щоб можна було розмежувати окремі фази активації кров'яних пластинок.

Низькі концентрації ADP (0,5 мкМ – 2 мкМ) зумовлюють двофазну агрегацію тромбоцитів. Під час цього процесу спостерігаються дві стадії зміни їхнього морфофункціонального стану: 1 – змінюється форма клітин, відбувається агрегація, дезагрегація, після чого відновлюється початковий рівень чутливості до ADP; 2 – відбувається необоротна агрегація тромбоцитів, асоційована з вивільненням з них щільних тілець. Ці гранули містять Ca^{2+} , пул накопичення аденілових нуклеотидів, катехоламіни, серотонін та ін. У другій фазі агрегація і секреція залежать від багатьох факторів, зокрема від простагландинних ендпероксидів, тромбоксану A_2 та ендogenous ADP. У публікаціях з'явилися повідомлення про те, що, власне, у другій фазі агрегації тромбоцитів PI-3-кіназа відіграє визначальну роль в індукції реакції вивільнення, тобто секреції зі щільних тілець [23]. Цей процес також тісно пов'язаний з активацією серин/треонінкінази [24].

За дії ADP у високих концентраціях (5 мкМ) обидві фази агрегації кров'яних пластинок зливаються і секреція відбувається як зі щільних тілець, так і з α -гранул, які містять фібриноген, фактор Віллебранда, β -тромбоглобулін, тромбоцитарний і трансформувальний фактори росту.

Одержані результати дозволяють простежити, як змінюється вміст p85 α в цитозольній фракції тромбоцитів за умов дослідження, дина-

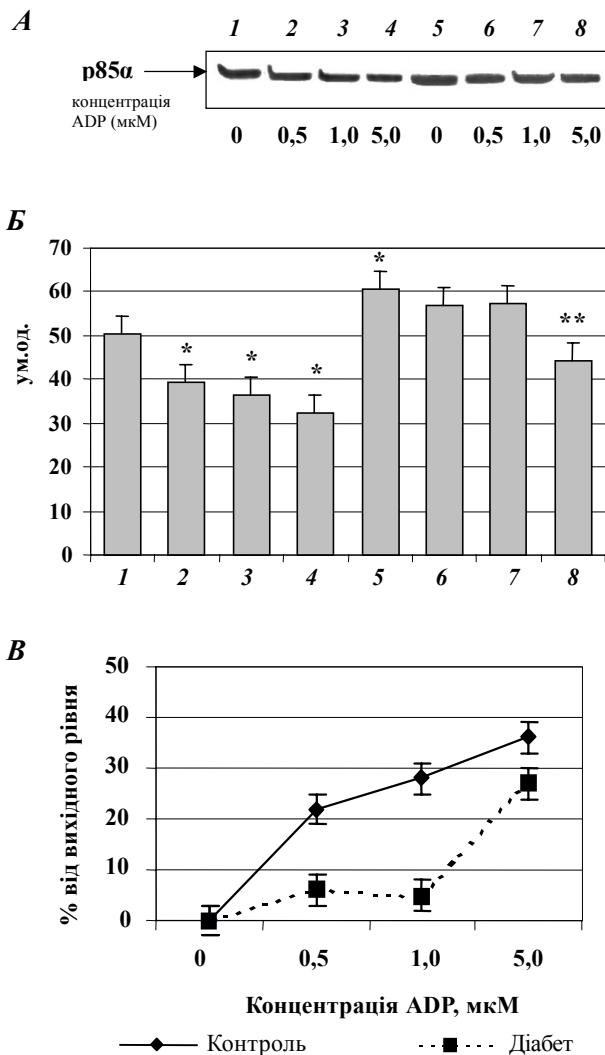


Рис. 2. Вплив різних концентрацій індуктора агрегації ADP на рівень p85α у фракції тромбоцитів, розчинній у тритоні X-100. А – імуноблотинг p85α тромбоцитів здорових донорів (треки 1–4) та хворих на цукровий діабет 1-го типу (треки 5–8); Б – динаміка рівня p85α у детергентрозчинній фракції тромбоцитів; В – динаміка транслокації p85α в цитоскелетну фракцію тромбоцитів.

міку транслокації регуляторної субодиниці PI-3-кінази в цитоскелетну фракцію, показник якої обчислювали як відсоток від вихідного рівня (рис. 2, В).

У здорових донорів (рис. 2, А, 2, Б – треки 1–4) вміст p85α у фракції тромбоцитів, розчинній у тритоні X-100, знижується з підвищенням концентрації індуктора, а крива, яка характеризує динаміку транслокації PI-3-кінази (рис. 2, В), свідчить про дедалі більше включення її в цитоскелетну фракцію. Для хворих на цукровий діабет 1-го типу (рис. 2А, 2Б – треки 5–8, 2В) відповідно характерною є сповільнена інкорпо-

рація ферменту за дії ADP в низьких концентраціях (двофазна агрегація) і лише за високої концентрації агоніста агрегації (однофазна агрегація) спостерігаються вірогідні зміни вмісту p85α у фракції тромбоцитів, розчинній у тритоні X-100 та транслокації PI-3-кінази в цитоскелетну фракцію.

Аналіз робіт, присвячених впливу NO на агрегаційну функцію тромбоцитів, свідчить про те, що він здійснюється на ранніх етапах їхньої активації, тобто ще до інтегринзалежної інкорпорації PI-3-кінази в цитоскелет клітини [25]. Уповільнена транслокація ферменту в цитоскелетну фракцію кров'яних пластинок у хворих на цукровий діабет 1-го типу за дії ADP у низьких концентраціях на фоні їхньої високої агрегаційної здатності може свідчити про зниження контролю NO над процесами, що забезпечують зміни морфофункціонального стану кров'яних пластинок за цієї патології.

Автори глибоко вдячні к.б.н. Л. Б. Дробот за участь в обговоренні результатів.

ROLE OF PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE IN PLATELET AGGREGATION UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

N. O. Sybirna¹, O. I. Vovk², M. M. Velykyi³

¹Ivan Franko Lviv National University;

²Institute of Cell Biology,

National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;

³Bogomolets National Medical Institute, Ukraine, Kyiv;

e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

S u m m a r y

It was found that incubation of platelet rich plasma with wortmannin, an irreversible selective inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), leads to sharp drop in platelet aggregation ability in healthy donors, whereas in type 1 diabetes mellitus patients this effect was less manifested or not quite determined. Translocation dynamics of PI3K regulatory subunit into cytoskeleton fraction under induction of platelet aggregation by various ADP concentrations and after wortmannin treatment was studied. Reciprocal interaction of endothelial constitutive NO synthase with PI3K in mechanisms of platelet functional state regulation under studied pathological and normal conditions have been analyzed.

К е у w o r d s: phosphoinositide 3-kinase, platelets, aggregation, type 1 diabetes mellitus.

1. Levy S. B. // N. Engl. J. Med. 1984. **311**, N 10. P. 663–665.

2. *Ishii H., Umeda F., Hashimoto T.* // *Diabetes*. 1990. **39**, N 12. P. 1561–1568.
3. *Wallerath T., Gath I., Aulitzky W. E. et al.* // *Thrombosis and Haemostasis*. 1997. **77**, N 1. P. 163–167.
4. *Pigazzi A., Heydrick S., Loscalzo J.* // *J. Biol. Chem.* 1999. **274**, N 20. P. 14368–14375.
5. *Красильников М. А.* // *Биохимия*. 2000. **65**, № 1. С. 68–78.
6. *Rittenhouse S.* // *Blood*. 1996. **88**, N 12. P. 4401–4414.
7. *Hartwig J., Kung S., Kovacsics et al.* // *J. Biol. Chem.* 1996. **271**, N 51. P. 32986–32993.
8. *Zhang J., Fry M. J., Waterfield M. D.* // *Ibid.* 1992. **267**, N 7. P. 4686–4692.
9. *Ferrell J. E., Martin G. S.* // *Ibid.* 1989. **264**, N 34. P. 20723–20729.
10. *Peterson G. L.* // *Anal. Biochem.* 1977. **83**, N 2. P. 346–358.
11. *Laemmli U. K.* // *Nature*. 1970. **227**, N 259. P. 680–685.
12. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* // *Biotechnology*. 1992. **24**, N 2. P. 145–149.
13. *Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения / Под. ред. А. Т. Мокроносова.* М: ВО “Агропромиздат”. 1989. 460 с.
14. *Clutton P., Miermont A., Freedman J. E.* // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. **24**, N 1. P. 187–192.
15. *Mazzanti L., Mutus B.* // *Clinical Biochemistry*. 1997. **30**, N 7. P. 509–515.
16. *Pahan K., Raymond J. R., Singh I.* // *J. Biol. Chem.* 1999. **274**, N 11. P. 7528–7536.
17. *Snyder S. H., Jaffrey S. R.* // *Nature Cel. Biol.* 1999. N 1. P. E95–96.
18. *Keating F., Sobel B., Schneider D.* // *Amer. J. Cardiol.* 2003. **92**, N 11. P. 1362–1365.
19. *Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М.* // *Сахарный диабет*. 1999. **1**, № 2. С. 2–8.
20. *Klein R., Klein B., Moss S.* // *Ann. Intern. Med.* 1996. **124**, N 1. P. 90–96.
21. *Горрен А. К. Ф., Майер Б.* // *Биохимия*. 1998. **63**, N 7. С. 870–880.
22. *Сибірна Н. О., Вовк О. І., Дробот Л. Б.* // *Вісник Львів. нац. ун-ту ім. Івана Франка*. 2003. № 34. С. 52–56.
23. *Li Z., Zhang G., Breton G. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2003. **278**, N 33. P. 30725–30731.
24. *Woulfe D., Jiang H.* // *J. Clin. Invest.* 2004. **113**, N 3. P. 441–450.
25. *Guinebault C., Payrastra B., Racaud-Sultan C. et al.* // *J. Cell Biol.* 1995. **129**, N 3. P. 831–842.

Отримано 15.03.2004