

---

# ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА КЛЕТОК В ХОДЕ БАРЬЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ, ВЫЗВАННОЙ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТРОМБИНА\*

**И.Б. Алиева**

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова  
*Москва, Россия, 119992*

**И.З. Еремина, О.Б. Саврова**

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии  
Российский университет дружбы народов  
*ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, Россия, ГСП, 117198*

**А.Д. Верин**

Центр сосудистой биологии,  
Медицинский Колледж Джорджии  
*Агаста, Джорджия, США*

Работа, выполненная на модели эндотелиального пласта *in vitro*, посвящена исследованию механизмов, приводящих к барьерной дисфункции эндотелия. В качестве индуктора дисфункции использовался тромбин. Тромбин действует на эндотелиоциты через специфический рецептор, запуская каскады внутриклеточных реакций, приводящих к росту проницаемости эндотелиального барьера, сопровождаемому увеличением фосфорилирования легких цепей миозина и перестройкой цитоскелета эндотелиальной клетки (деполимеризацией периферических микротрубочек и формированием дополнительных стресс-фибрилл). Взаимодействие тромбина с рецептором приводит к диссоциации субъединиц гетеротримерных G-белков семейств Gi, Gq и G12/13, каждая из которых потенциально способна регулировать один или несколько возможных путей развития дисфункции. В настоящем исследовании анализировали роль Gi белка в возникновении цитоскелетных нарушений, приводящих к барьерной дисфункции. Активированный Gi белок уменьшает уровень внутриклеточного медиатора — циклического АМФ и регулирует проницаемость ионных каналов. Действие активатора аденилатциклаза форсколина показало, что уровень цАМФ в клетке не влияет на изменения актинового цитоскелета и микротрубочек, вызываемые тромбином. Таким образом, можно предположить, что низкий уровень цАМФ не является обязательным условием для изменения цитоскелета под действием тромбина и активность Gi белка напрямую не влияет на барьерные свойства эндотелия.

**Ключевые слова:** легочный эндотелий, барьерная функция эндотелия, дисфункция эндотелия, тромбин, актиновые филаменты, микротрубочки.

Эндотелиальный слой, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов организма, выполняет барьерную функцию — регулирует проницаемость сосудистой стенки, обеспечивая постоянный обмен между циркулирующей кровью и тканевой жидкостью. Нарушение нормальной функции (дисфункция) эндотелия связано с последовательной перестройкой цитоскелета клеток, активацией актомиозинового сокращения и, как следствие, образованием промежутков между эндотелиальными клетками. Актуальность исследования нарушений барьерной функции

---

\* Работа выполнена при поддержке грантов NIH (HL067307 и HL080675) и РФФИ (№ 06-04-49233 и № 09-04-00363).

эндотелия обусловлена тем, что дисфункция является причиной повышения проницаемости сосудистой стенки, наблюдаемого при многих заболеваниях человека, а кроме того, является частым осложнением в практике лечения онкологических больных препаратами, блокирующими митоз.

Для исследования барьерной функции *in vitro* в настоящее время успешно используются клеточные линии животных и человека, полученные из различных сосудов — артерий, вен, капилляров. На клеточных моделях было показано, что барьерную дисфункцию эндотелия *in vitro* могут запускать как естественные факторы (например, тромбин), так и целый ряд внешних воздействий. Тромбин, действуя на клетки через специфический PAR-1 рецептор, запускает каскады внутриклеточных реакций, что в приводит к росту проницаемости эндотелиального барьера, сопровождаемому уже перечисленными признаками дисфункции — увеличением фосфорилирования легких цепей миозина и формированием дополнительных стресс-фибрилл в эндотелиальных клетках. При этом взаимодействие тромбина с его рецептором PAR-1 приводит к диссоциации субъединиц гетеротримерных G-белков семейств Gi, Gq и G12/13, каждая из которых способна выступать в качестве регулятора одного или нескольких возможных путей развития дисфункции. Активация чувствительного к коклюшному токсину Gi белка ведет к ингибированию аденилат-циклазы [1]. Gq-зависимая активация фосфолипазы C приводит к увеличению уровня инозитол-3-фосфата и диацилглицерола, увеличению концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, активации протеинкиназы C α, в результате, — к перестройке актинового цитоскелета [2]. И, наконец, G12/13 отвечает за Ca-независимую активацию Rho-белков [3], напрямую приводящую к барьерной дисфункции эндотелия [4]. На настоящий момент наиболее исследованным является именно Rho-Rho-киназный путь развития дисфункции, где в качестве первоначальной реакции выступает деполимеризация микротрубочек (MT) на краю клетки, однако возможным представляется и каскад, связанный с регуляцией Gi ингибиторного белка и аденилатциклазы.

**Целью исследования** являлся анализ роли Gi белка в возникновении цитоскелетных нарушений, приводящих к барьерной дисфункции эндотелия.

**Материалы и методы.** Культура эндотелиальных клеток (EC) легочной артерии человека была получена из компании Clonetics BioWhittaker Inc. (США). EC выращивали на среде EGM-2 (Clonetics BioWhittaker Inc., США) при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Для экспериментов использовали клетки 6—10 пассажей.

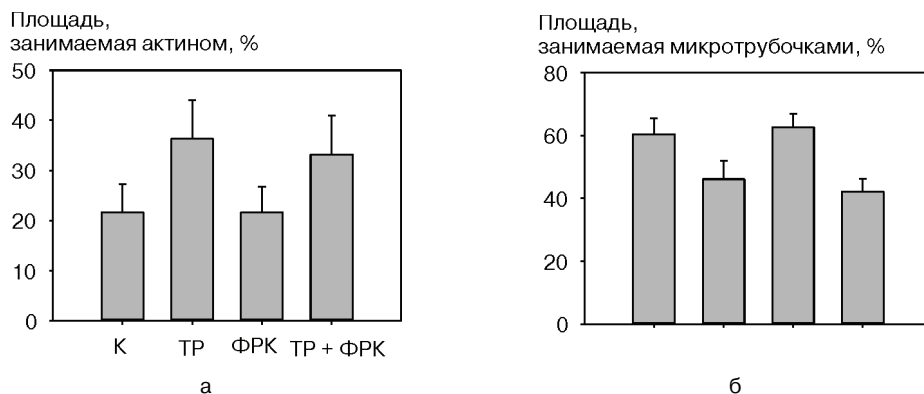
**Экспериментальные воздействия.** В экспериментах использовали тромбин (Sigma, США) в концентрации 25 нМ. Перед воздействием тромбина EC промывали бессывороточной средой и стимулировали тромбином также в среде, не содержащей сыворотки, 30 мин. Форсколин («Sigma», США) использовали в концентрации 50 мкМ в течение 1 ч. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировали 1,5% раствором глутарового альдегида (Sigma, США) на физиологическом фосфатном буфере (PBS), pH = 6,8 в течение 10 мин. Дальнейшую подготовку и окраску клеток первыми и вторыми антителами проводили, как описано ранее [5].

**Получение и обработка цифровых изображений.** Для исследования полученных после иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов использовали микроскоп Nikon Eclipse TE2000 (Nikon Intech Co., Япония). Изображения записывали с помощью цифровой охлаждаемой ПЗС-камеры Hamamatsu ORCA-2 (Hamamatsu Photonics, Япония), управляемой программой MetaView (Universal Imaging, США), используя объектив 60/1,4. Разрешение полученных 12-битных изображений составляло 9 пиксел/мкм. Обработка изображений проводилась в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., США).

**Количественная оценка** состояния системы МТ и актиновых филаментов производилась по методике, разработанной ранее [5]. Данные обрабатывали статистически в программе Sigma Plot 7.1 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США).

**Результаты и обсуждение.** Действуя через специфический рецептор, тромбин активирует связанные с рецептором G-белки, что приводит к запуску множества регуляторных путей в ЕС. Объект настоящего исследования — Gi (ингибиторный) белок — уменьшает уровень внутриклеточного медиатора, циклического АМФ, в клетке и регулирует проницаемость ионных каналов. Синтез цАМФ из АТФ катализируется ферментом аденилатциклазой. Повысить уровень цАМФ в ЕС можно искусственно, при использовании специфического активатора аденилатциклаз — форсколина. Поэтому в настоящей работе для того, чтобы определить регуляторные возможности Gi белка, а следовательно, и роль цАМФ в процессе изменения цитоскелета ЕС при действии тромбина, повышали уровень цАМФ в ЕС, используя форсколин. В норме в ЕС методом иммунофлуоресцентного окрашивания выявляется актиновая сеть, содержащая тонкие пучки, расположенные в основном по периферии клетки. МТ расположены наиболее плотно в центре ЕС, в районе centrosомы, и их плотность понижается по направлению к краю клетки [6]. Воздействие тромбина (25 нМ) вызывает увеличение количества стресс-фибрилл в течение первых 30 мин. воздействия (см. рис. 1, а). При этом площадь, занимаемая МТ, снижается с 60 до 45% (рис. 1, а). Уменьшение площади, занимаемой МТ, происходит за счет элиминации периферических МТ [6].

**Цитоскелет эндотелиальных клеток при действии форсколина.** Форсколин в концентрации 50 мкМ в течение 1 ч не вызывал существенных изменений в морфологии эндотелиальных клеток. Характер расположения актиновых филаментов в объеме клетки, а также их толщина и взаиморасположение в обработанных форсколином клетках не отличались от нативных клеток. Площадь, занимаемая актиновыми филаментами, составила  $21,6 \pm 5,1\%$  ( $n = 15$ ) от площади всей клетки, что соответствует площади актиновых филаментов в контроле (рис. 1, а). Система МТ после обработки форсколином визуально не изменилась — расположение, общее строение сети и взаимная ориентация МТ соответствовали норме. Количественные измерения показали, что занимаемая МТ площадь соответствовала контрольной и составила  $62,6 \pm 4,2\%$  ( $n = 15$ ) от площади всей клетки (рис. 1, б). Некоторое увеличение количества МТ произошло в центре клетки, где площадь МТ составила  $83,3 \pm 5,8\%$  ( $n = 15$ ). Таким образом, действие форсколина не приводит к изменениям в структуре актинового цитоскелета и системы МТ эндотелиоцитов.



**Рис. 1.** Графики, описывающие изменение количества стресс-фибрилл (а) и микротрубочек (б) в эндотелиоцитах человека при воздействии тромбина (ТР) и форсколина (ФРК) в сравнении с нормой (К).

**Цитоскелет эндотелиальных клеток при действии тромбина в присутствии форсколина.** Для выяснения роли цАМФ в реакции цитоскелета ЕС на действие тромбина в клетках повышали уровень цАМФ, а затем стимулировали тромбином в концентрации 25 нМ. Для сравнения использовали результаты действия тромбина в отсутствие активатора аденилатциклаз. Анализ изображений показал, что существенных изменений в структуре актинового цитоскелета и системы МТ при действии тромбина, в сравнении с действием тромбина в присутствии форсколина, не происходит. Количество стресс-фибрилл оказывается увеличенным по сравнению с нормой, они занимают всю площадь клетки и собраны в толстые пучки. Площадь, занимаемая актиновыми филаментами, соответствует их площади в отсутствие форсколина ( $33,2 \pm 7,7\%$ ) (см. рис. 1, а). Сеть МТ разрежена за счет их деполимеризации на периферии клетки. Площадь, занимаемая МТ, также не изменяется и составляет  $42,1 \pm 4,1\%$  (см. рис. 1, б). Полученные результаты позволяют заключить, что уровень цАМФ в клетке не влияет на изменения актинового цитоскелета и вовлеченных в поддержание барьерной функции динамичных МТ, вызываемых тромбином. Таким образом, по-видимому, низкий уровень цАМФ не является обязательным условием для изменений цитоскелета под действием тромбина, и активность Gi белка напрямую не влияет на барьерные свойства эндотелия.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Manolopoulos V.G., Fenton J.W. II, Lelkes P.I. The thrombin receptor in adrenal medullary microvascular endothelial cells is negatively coupled to adenylyl cyclase through a Gi protein // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1997. — № 1356. — С. 321—332.
- [2] Barr A.J., Brass L.F., Manning D.R. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor. G protein coupling // *J. Biol. Chem.* — 1997. — № 272. — С. 2223—2229.
- [3] Buhl A.M., Johnson N.L., Dhanasekaran N., Johnson G.L. // *J. Biol. Chem.* — 1995. — № 270. — С. 24631—24634.
- [4] Birukova A., Birukov K., Smurova K., Kaibuchi K., Alieva I., Garcia J.G., Verin A. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *FASEB J.* — 2004. — № 18. — С. 1879—1890.

- [5] Smurova K.M., Birukova A.A., Verin A.D., Alieva I.B. Dose-Dependent Effect of Nocodazole on Endothelial Cell Cytoskeleton // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. — 2008. — Vol. 2. — № 2. — P. 119—127.
- [6] Смурова К.М., Бирюкова А.А., Гарсия Д., Воробьев И.А, Алиева И.Б., Верин А.Д. Реорганизация системы микротрубочек в клетках легочного эндотелия в ответ на воздействие тромбина. Цитология. — 2004. — Т. 46 — № 8. — С. 695—703.

## **EFFECT OF ADENYLATE CYCLASES ACTIVATOR ON THE CYTOSKELETON REORGANIZATION IN THROMBIN-INDUCED ENDOTHELIAL BARRIER DYSFUNCTION**

**I.B. Alieva**

A.N. Belozersky Institute,  
Moscow State University  
*Moscow, Russia, 119992*

**I.Z. Eremina, O.B. Savrova**

Department of Histology, Cytology and Embriology  
People's Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198*

**A.D. Verin**

Vascular Biology Center, Medical College of Georgia  
*Augusta, USA*

This work executed on a model of endothelial monolayer *in vitro*, is devoted to the study of mechanisms leading to endothelial barrier dysfunction. The dysfunction inductor, thrombin, acts on endothelial cells through a specific receptor, triggering cascades of intracellular reactions (including cytoskeletal reorganization) resulting to increased of endothelial permeability. Thrombin-receptor interaction leads to dissociation of heterotrimeric G-protein subunits (Gi, Gq and G12/13), each of which is potentially capable to handle one or more possible ways of dysfunction development. In the present study we analyzed the role of Gi protein in the occurrence of cytoskeletal disturbances that lead to barrier dysfunction. According to our results, it can be assumed that the activity of Gi protein does not directly affect on the endothelial barrier properties.

**Key words:** pulmonary endothelium, endothelial barrier function, endothelial barrier dysfunction, thrombin, actin filaments, microtubules.