

РОЛЬ Src-ТИРОЗИНКИНАЗ У ПІДВИЩЕННІ ПРОНИКНОСТІ КРОВОНОСНИХ СУДИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ВИРАЗКОВОМУ КОЛІТІ

Г. М. ТОЛСТАНОВА^{1,2}, Т. А. ХОМЕНКО¹, Л. І. ОСТАПЧЕНКО²,
Ш. САБО¹, С. ШАНДОР¹

¹Каліфорнійський університет, Ірвайн, США;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: gtolstanova@gmail.com

Показано збільшення активності Src без змін у загальному рівні Src-протеїну на ранніх етапах розвитку спричиненого йодоацетамідом виразкового коліту в щурів. Введення Src інгібітора PP1 (0,2 мг/100 г, підшкірно) зменшувало ($P \leq 0,001$) проникність кровососних судин та рівень pSrc^{Tyr416} у слизовій оболонці товстої кишки при виразковому коліті, спричиненому йодоацетамідом. Аутофосфорилування та підвищення експресії VEGFR-2 під впливом йодоацетаміду було асоційоване з активацією Src та збільшенням міжпротеїнової взаємодії β -арестину 2 з VE-кадгерином, що можливо призводить до порушення адгезивних контактів між ендотеліальними клітинами. Дійшли висновку про провідну роль Src-тирозинкінази в механізмах підвищення проникності кровососних судин товстої кишки при експериментальному виразковому коліті.

Ключові слова: йодоацетамід, Src-тирозинкінази, виразковий коліт, проникність кровососних судин, VEGF.

Запальні захворювання кишечника, до яких належать виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона – хронічні запалення стінки кишечника невизначеної етіології [1]. Роботами останніх років показано роль неконтрольованого ангіогенезу в патогенезі запальних захворювань кишечника [2, 3]. Новоутворені судини в місці запалення характеризуються порушеною архітектонікою, підвищеною проникністю, що сприяє збільшенню інфільтрації лейкоцитів, затримці процесу гоєння виразок та хронізації процесу запалення [4].

Дослідження терапевтичної ефективності різних проангіогенних факторів росту при запальних захворюваннях кишечника виявили їхню різноспрямовану дію. Так, введення рекомбінантного протеїну до тромбоцитарного фактора росту (PDGF) [5], фактора росту фібробластів (bFGF) [5] чи фактора росту гепатоцитів (HGF) [6] на моделях запальних захворювань кишечника справляло лікувальну дію. Навпаки, підвищення рівня фактора росту кровососних судин (VEGF) шляхом введення VEGF аденовірусу погіршувало стан хворого [7], а нейтралізуюче антитіло до VEGF покращувало його [8]. VEGF, на відміну від інших проангіогенних факторів росту (PDGF, bFGF, HGF), окрім стимуляції проліферації та міграції ендотеліальних клітин, здатен підвищувати

проникність кровососних судин і за потужністю дії є сильнішим за гістамін у 50 тис. разів [9]. У наших дослідженнях було показано, що патологічна дія VEGF при експериментальному ВК пов'язана саме з підвищенням проникності кровососних судин у місці ураження та збільшенням інфільтрації лейкоцитів [8]. Ці дані узгоджуються з результатами, одержаними іншими дослідниками [7].

Родину Src-протеїнкіназ (аббревіатура від саркома) вперше описано та найбільш досліджено родину нерцепторних тирозинкіназ. До цієї родини належать Src, Fyn, Yes, Fgr, які широко представлені в різних тканинах, та Lck, Blk, Lyn, Hck, локалізація яких обмежується гематопоетичними клітинами [10]. Дослідження на мишах із відсутнім геном c-Src (c-Src^{-/-}-миші) показали провідну роль цих кіназ в VEGF-опосередкованій проникності кровососних судин, тоді як вплив VEGF на проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин залишався без змін [11]. Інтрадермальне введення VEGF аденовірусу у вуха чи стереотаксичне – в півкулі головного мозку c-Src^{-/-}-мишей не спричинювало збільшення проникності кровососних судин у зоні введення порівняно з нормальними тваринами. Більше того, J. Gavard та J. S. Gutkind [12] детально дослідили Src-залежний внутрішньоклітинний шлях VEGF-опосередкованої про-

никності шару ендотеліальних клітин. Вони показали, що активація VEGF рецептора-2 (VEGFR-2/Flk-1) VEGF зумовлює Src-залежне фосфорилування цитоплазматичного кінця VE-кадгерину. Фосфорильований VE-кадгерин зв'язується з β -арестином 2, що сприяє інтерналізації VE-кадгерину у везикулу, вкриту клатрином, та, як наслідок, роз'єднанню адгезивних контактів між ендотеліальними клітинами.

Таким чином, зважаючи на провідну роль Src-кіназ в VEGF-опосередкованій проникності кровоносних судин, метою нашої роботи було дослідити роль Src-тирозинкіназ у підвищенні проникності кровоносних судин при експериментальному виразковому коліті.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на 50 щурах-самках лінії Sprague-Dawley з масою тіла 160–200 г. Виразковий коліт спричинювали одноразовим ректальним введенням (7 см від анального отвору) 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma, США), розчиненим в 1%-му розчині метилцелюлози (Sigma, США), за допомогою гумового катетера S8 (Rüsch, Німеччина) [13]. Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл 1%-го розчину метилцелюлози. Щурів умертвляли шляхом інгаляції з CO₂ та наступною цервікальною дислокацією через 0,5, 1, 2 і 6 год після введення йодоацетаміду. Потім видаляли ділянку товстої кишки довжиною 7 см від анального отвору та відразу занурювали її в рідкий азот.

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері (50 мМ трис-HCl, pH 8,0; 150 мМ NaCl; 1% IGEPAL) з додаванням інгібіторів протеїназ (Sigma, США) та фосфатаз (ThermoScientific, США). Концентрацію загального протеїну вимірювали за методом Бредфорд з використанням набору «Bio-Rad для протеїнового аналізу» (Bio-Rad, США). Розділення та визначення протеїну (50 чи 100 мкг заг. протеїну/зразок) методом вестерн-блотинг проводили в 10%- чи 7%-му SDS-поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно зі стандартним протоколом фірми Bio-Rad. Антитіла проти VEGFR-2 (1 : 200), pVEGFR-2/Flk-1^{Tyr951} (1 : 250) (Santa-Cruz Biotech., США), Src (1 : 1000) (Cell signaling, США) використовували для визначення рівня відповідних протеїнів у стінці товстої кишки з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованим антитілом (1 : 3000; Santa-Cruz Biotech., США).

Як відомо, активність Src регулюється шляхом фосфорилування двох тирозинових залишків: розташованого в активному центрі каталітичного домену Tyr416, який відповідає за активацію, та Tyr527, локалізованого в С-кінцевій області ензиму, що пов'язаний з інактивацією [15]. Для визначення ступеня активації Src-протеїну ми вимірювали експресію фосфорильованого Src-протеїну, використовуючи первинне антитіло, що розпізнає ендogenous рівень Src у стані фосфорилування за тирозином 416 [pSrc^{Tyr416} (1 : 750), Cell signaling, США]. Візуалізацію вестерн-блотингу проводили ECL-регентом (Amersham Biosciences, США). Результати різних експериментів (не менше трьох) аналізували за допомогою програми Phoretix1D.

Для імунопреципітації використовували 3 мкг первинного антитіла проти VE-кадгерину (Santa Cruz Biotech., США) із розрахунку на 250 мкг загального протеїну на пробу та 100 мкл гранул Dynabeads-протеїну G (Invitrogen, США). Зазначені компоненти змішували на роторі протягом однієї години при 4 °C. Після цього імунний комплекс промивали 3 рази 1 мл фосфатного буфера (PBS, pH 7,4), додавали 40 мкл буфера Леммлі для вестерн-блотингу та інкубували 5 хв, при 95 °C. Імунопреципітовані протеїни розділяли та візуалізували за допомогою вестерн-блотингу з використанням первинних антитіл проти VE-кадгерину (1 : 500), β -арестину 2 (1 : 500) (Santa Cruz Biotech., США).

Для кількісного аналізу проникності кровоносних судин товстої кишки ми використовували трипановий синій (фарба Еванса) згідно з рекомендаціями [14]. Витікання фарби у стінку кишки свідчить про підвищення проникності судин. Щурів анестезували ізофлураном. Фарбу Еванса (0,4 мг/100 г у фосфатному буфері (pH 7,4; Sigma, США) вводили внутрішньовенно за 15 хв до аутопсії. Щурів умертвляли через 30 хв після ректального введення 6%-го йодоацетаміду або 1%-го розчину метилцелюлози (контрольна група). Видалену ділянку товстої кишки, промивали, промокали фільтрувальним папером та зважували. Фарбу Еванса зі слизової оболонки товстої кишки екстрагували хлороформом [16]. Концентрацію фарби вимірювали за довжини хвилі 610 нм на спектрофотометрі Beckman Coulter DU (Beckman, США). Дані розраховували у міліграмах фарби Еванса/г товстої кишки.

Для визначення ролі Src-тирозинкіназ у збільшенні проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному ВК ми

використовували селективний блокатор родини Src-тирозинкіназ PP1 (піразолопіримідин, 4-аміно-5-(4-метилфеніл) – 7-(*t*-бутил) піразоло [3,4-*d*] піримідин) (Biomol International, L.P., США) в дозі 0,2 мг/100 г в диметилсульфоксиді (ДМСО) підшкірно. Контрольній групі тварин вводили 0,1 мл ДМСО підшкірно за 1,5 год до моделювання ВК йодоацетамідом. Щурів умертвляли через 30 хв після введення йодоацетаміду.

Результати обробляли статистично за *t*-критерієм Стьюдента. Дані представлені у вигляді $M \pm \sigma$, *n* – кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Визначено експресію та активність Src-протеїну в протеїновому екстракті слизової оболонки товстої кишки щурів на ранніх етапах розвитку ВК, спричиненого йодоацетамідом. Рівень експресії загального Src-протеїну не змінюється в різні терміни після введення йодоацетаміду (рис. 1). Не дивлячись на відсутність змін в експресії загального Src-протеїну, ми спостерігали достовірне збільшення рівня фосфорильованого Src (Tyr416) протеїну на ранніх етапах розвитку ВК спричиненого йодоацетамідом (рис. 1). На сьогоднішній день відомості щодо змін активності Src-кіназ при запальних захворюваннях кишечника обмежуються дослідженнями на ізольованих клітинах епітелію кишечника та не відображають загальної картини можливої ролі Src-кіназ в механізмах цієї патології. Так, встановлено зниження загального рівня та активності Src-кіназ в ізольованих епітеліальних клітинах товстої кишки хворих на запальні захворювання кишечника, яке може бути пов'язано з порушенням Src-залежного механізму виживання епітеліальних клітин [17].

Вивчено проникність кровоносних судин товстої кишки при ВК спричиненого йодоацетамідом. ВК спричинений йодоацетамідом характеризується швидким розвитком ознак хвороби з утворенням ерозій та виразок вже через 6 годин після його введення. За нашими гістологічними даними перші прояви периваскулярного набряку, що є ознакою збільшення проникності кровоносних судин, спостерігаються вже через 30 хв після ректального введення йодоацетаміду [18] поряд зі збільшенням ступеня фосфорильовання Src (Tyr416) (рис. 1). Беручи до уваги вищезазначене, для перевірки ролі Src-кіназ у збільшенні проникності кровоносних судин товстої кишки, щурам вводили

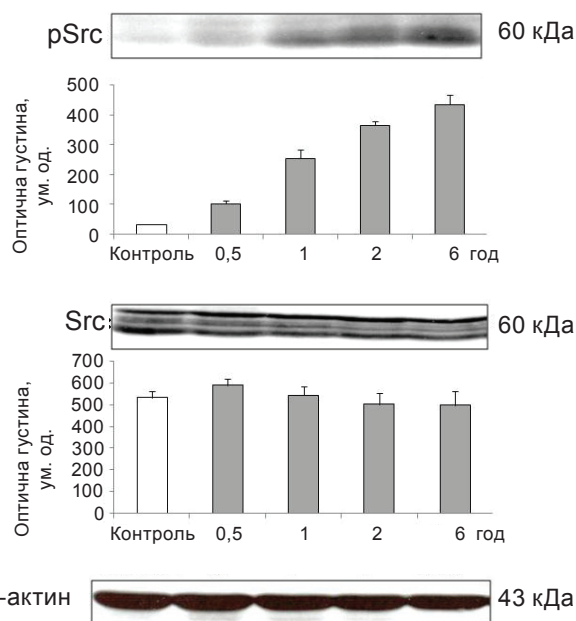


Рис. 1. Експресія загального протеїну Src та *pSrcTyr416* в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни розвитку виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом (вестерн-блотинг; $n = 3$; $M \pm \sigma$)

селективний блокатор родини Src-тирозинкіназ PP1 (0,2 мг/100 г) за 1,5 год до ректального введення йодоацетаміду. Через 30 хв дії йодоацетаміду перевіряли вплив селективного блокатора на проникність судин. Ефективну дозу PP1 розраховували, виходячи з його дії у попередженні набряку на моделі інсульту в мишей *in vivo* [19].

Контрольна група щурів, яким ректально вводили метилцелюлозу, мала незначну проникність кровоносних судин товстої кишки, яка становила $2,91 \pm 2,11$ (мг фарби Еванса/г тканини товстої кишки). Введення щурам йодоацетаміду вірогідно збільшує цей показник до $7,10 \pm 2,66$ ($P \leq 0,001$). Блокада активності Src-тирозинкіназ PP1 майже повністю знімає спричинене йодоацетамідом збільшення проникності кровоносних судин товстої кишки і зменшує цей показник до $3,15 \pm 1,29$ ($P \leq 0,001$) (рис. 2, А).

Для підтвердження зменшення активності Src-кінази ми перевірили рівень експресії загального Src-протеїну та фосфорильованого Src (Tyr416) за дії PP1. Показано, що PP1 не впливає на рівень експресії загального Src-протеїну, але пригнічує активність Src, що призводить до зменшення рівня його фосфорильовання ($P = 0,017$). Так, оптична густина смужок імуноблотингу в групі, що отриму-

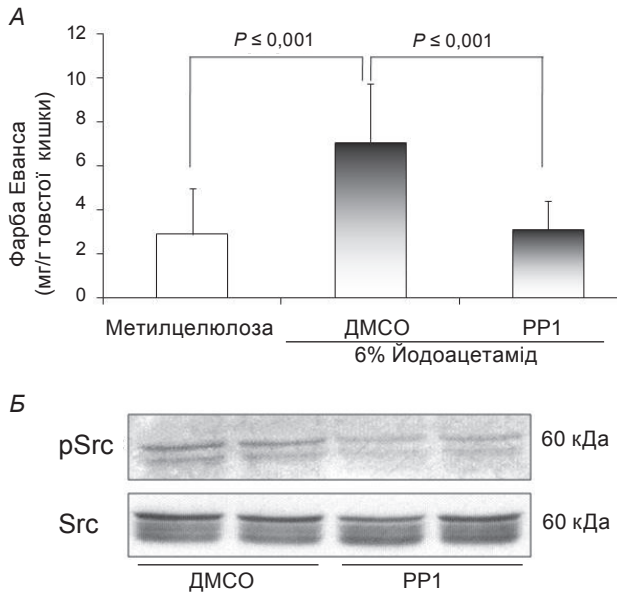


Рис. 2. Вплив Src-інгібітора PP1 (0,2 мг/100 г) на проникність кровоносних судин товстої кишки на фоні виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом. А – проникність кровоносних судин, визначено методом екстракції фарби Еванса. Б – експресія протеїнів методом вестерн-блотингу (n = 10, M±σ)

вала ДМСО, становить $204,6 \pm 97,7$ (ум. од.), а у групі, якій вводили PP1 – $78,98 \pm 46,68$ (ум. од.) (рис. 2, Б).

Роль Src-кіназ в VEGF-опосередкованій проникності кровоносних судин була показана в дослідженнях багатьох авторів на різноманітних об'єктах: ендотеліальних клітинах сітківки свиней [20], моделях церебральної ішемії [21] та інсульту [19]. Причому відомо, що Src переважно зв'язується з VEGFR-2/FLK-1 ніж VEGFR-1/Flt-1 за опосередкування VEGF-залежної проникності шару ендотеліальних клітин [22]. Важливо також зауважити, що Src-активність є необхідним компонентом VEGF-опосередкованого впливу на проникність кровоносних судин та ангиогенез і не бере участі у трансдукції bFGF-опосередкованих сигналів [11]. У дослідженнях на ізольованих ендотеліальних клітинах людини показано, що кінцевою ланкою VEGF-VEGFR-2-Src-залежного шляху збільшення проникності ендотеліального шару є зв'язування β-арестину 2 з

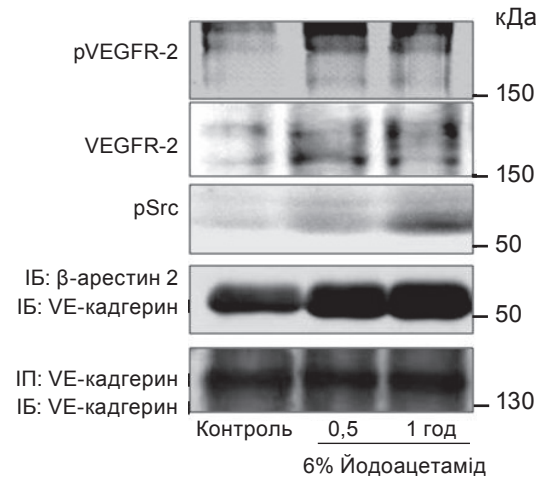


Рис. 3. Внутрішньоклітинний шлях VEGFR-2-Src-залежного шляху збільшення проникності кровоносних судин товстої кишки на фоні виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом, ІБ – імуноблот; ІП – імунопреципітація (n = 3)

VE-кадгерином та наступною інтерналізацією VE-кадгерину у клітину, що призводить до порушення адгезивних контактів між ендотеліальними клітинами та роз'єднанню їх [12].

У наших дослідженнях введення йодоацетаміду спричинює не тільки збільшення експресії VEGFR-2, а також його активацію шляхом аутофосфорилування у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Паралельно спостерігається активація Src, яка виявляється збільшенням фосфорилування за Tug416. Ми показали вірогідне підвищення міжпротеїнової взаємодії β-арестину 2 та VE-кадгерину, тоді як загальний рівень VE-кадгерину залишався без змін (рис. 3).

Таким чином, можна дійти наступного висновку: 1) Src-кінази відіграють провідну роль у механізмах підвищення проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному ВК; 2) утворення комплексу між β-арестином 2 та VE-кадгерином, що призводить до порушення адгезивних контактів між ендотеліальними клітинами, можливо є основним у VEGFR-2-Src-залежному підвищенні проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному ВК.

**РОЛЬ Src-ТИРОЗИНКИНАЗ
В ПОВЫШЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ
КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ**

А. Н. Толстанова^{1,2}, Т. А. Хоменко¹,
Л. И. Остапченко², Ш. Сабо¹, С. Шандор¹

¹Калифорнийский университет, Ирвайн, США;

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: gtolstanova@gmail.com

Показано увеличение активности Src без изменения общего уровня Src-протеина на ранних этапах развития язвенного колита (ЯК), вызванного йодоацетамидом. Введение Src ингибитора PP1 (0,2 мг/100 г, подкожно) уменьшало ($P \leq 0,001$) проницаемость кровеносных сосудов (ПКС) толстой кишки и уровень pSrc^{Tyr416} на фоне ЯК вызванного, йодоацетамидом. Вызванное йодоацетамидом аутофосфорилирование и повышение экспрессии VEGFR-2 ассоциировано с активацией Src и увеличением межпротеинового взаимодействия между β -аррестином 2 и VE-кадгеринном, что влечет за собой нарушение адгезивных контактов между эндотелиальными клетками. Сделан вывод о ведущей роли Src киназ в механизмах повышения ПКС толстой кишки при экспериментальном ЯК.

Ключевые слова: йодоацетамид, Src-киназы, язвенный колит, проницаемость кровеносных сосудов, VEGF.

**THE ROLE OF Src TYROSINE
KINASES IN INCREASING
VASCULAR PERMEABILITY DURING
EXPERIMENTAL ULCERATIVE
COLITIS**

G. M. Tolstanova^{1,2}, T. A. Khomenko¹,
L. I. Ostapchenko², S. Szabo¹, Zs. Sandor¹

¹University of California-Irvine,
Long Beach, CA, USA,

²Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: gtolstanova@gmail.com

S u m m a r y

We have shown the increase of Src^{Tyr416} phosphorylation in rat colonic mucosa at early stages of 6% iodoacetamide-induced ulcerative colitis (UC), while the level of Src protein expression was not changed. Pretreatment of rats with Src inhibitor PP1 (0.2 mg/100 g, subcutaneously) decreased

the colonic vascular permeability (VP) ($P \leq 0.001$) and pSrc^{Tyr416} level during iodoacetamide-UC. Iodoacetamide-induced autophosphorylation and up-regulation of VEGFR-2 was associated with Src activation in colonic mucosa of rats. Sequentially, protein-protein interaction between β -arrestine2 and VE-cadherine was enhanced, that might be a reason of colonic endothelium barrier disruption. We concluded that Src plays a key role in the mechanisms of increasing the colonic VP during experimental UC.

Key words: iodoacetamide, Src-kinase, ulcerative colitis, vascular permeability, VEGF.

1. Abreu M. T. // Curr. Gastroenterol. Rep. — 2002. — 4, N 6. — P. 481–489.
2. Spalinger J., Patriquin H., Miron M. C. et al. // Radiology. — 2000. — 217, N 3. — P. 787–791.
3. Chidlow J. H. Jr., Langston W., Greer J. et al. // Am. J. Pathol. — 2006. — 169, N 6. — P. 2014–2030.
4. Carmeliet P. // Nature Med. — 2003. — 9, N 6. — P. 653–660.
5. Szabo S., Sandor Z. // Baillieres. Clin. Gastroenterol. — 1996. — 10, N 1. — P. 97–112.
6. Thatch K. A., Mendelson K. G., Haber M. M., Schwartz M. Z. // J. Surg. Res. — 2009. — 156, N 2. — P. 245–249.
7. Scaldaferrri F., Vetrano S., Sans M. et al. // Gastroenterology. — 2009. — 136, N 2. — P. 585–595.
8. Tolstanova G., Khomenko T., Deng X. et al. // Gut. — 2008. — 57. — P. A39.
9. Dvorak H. F., Nagy J. A., Feng D. et al. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. — 1999. — 237. — P. 97–132.
10. Neet K., Hunter T. // Genes cells. — 1996. — 1. — P. 147–169.
11. Eliceiri B. P., Paul R., Schwartzberg P. L. et al. // Mol. Cell. — 1999. — 4, N 6. — P. 915–924.
12. Gavard J., Gutkind J. S. // Nat. Cell. Biol. — 2006. — 8, N 11. — P. 1223–1234.
13. Satoh H., Sato F., Takami K., Szabo S. // Jpn. J. Pharmacol. — 1997. — 73, N 3. — P. 299–309.
14. Rogers D. F., Boschetto P., Barnes P. J. // J. Pharmacol. methods. — 1989. — 21, N 4. — P. 309–315.
15. Thomas J. E., Soriano P., Brugge J. S. // Science. — 1991. — 254, N 5031. — P. 568–571.
16. Baluk P., Thurston G., Murphy T. J. et al. // Br. J. Pharmacol. — 1999. — 126, N 2. — P. 522–528.
17. Hofmann C., Lippert E., Falk W. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2009. — 390, N 3. — P. 908–914.

18. Tolstanova G., Deng X. M., Khomenko T. et al. // *Gastroenterology*. – 2009. – **136**, N 5. – P. A774.
19. Paul R., Zhang Z. G., Eliceiri B. P. et al. // *Nat. Med.* – 2001. – **7**, N 2. – P. 222–227.
20. Sheikpranbabu S., Kalishwaralal K., Venkataraman D. et al. // *Nanobiotechnology*. – 2009. – **7**. – P. 8.
21. Liang S., Pong K., Gonzales C. et al. // *Pharmacol. Exp. Ther.* – 2009. – **331**, N 3. – P. 827–835.
22. Chou M. T., Wang J., Fujita D. J. // *BMC Biochem.* – 2002. – **3**. – P. 32.

Отримано 28.12.2009