

УДК 576.5+577.2

РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ИНТЕГРИНА БЕТА-2 В ГАЗООБМЕНЕ КЛЕТОК ЛЕГКИХ МЫШЕЙ

Р.Т. Мухаметшина, А. Мехта, К.Т. Прайснер, Г. Баррето, Т.В. Багаева

Аннотация

Проведено исследование влияния экспрессии гена интегрина Itgb2 клеток легких мыши на функционирование дыхательной системы организма животного. Эксперименты проводились на мышах дикого типа (C57BL/6) и мышах, у которых методом нокаута был ингибирован ген, ответственный за синтез интегрина Itgb2 (Itgb2^{-/-}). Обнаружено, что у нокаутных мышей наблюдается достоверное снижение потребления кислорода по сравнению с мышами дикого типа, несмотря на видимое отсутствие морфологических изменений как на уровне самого организма, так и на образцах гистологических срезов легких. Снижение потребления кислорода у нокаутных мышей приводит к количественному разобщению между процессами потребления кислорода и количеством выдыхаемого углекислого газа, что при дальнейшем развитии животного может привести к возникновению необратимых изменений в клетках легкого. Полученные результаты свидетельствуют о том, что одной из функций интегрина Itgb2 является его участие в процессе газообмена клеток легких мышей.

Ключевые слова: интегрины, газообмен, легкие мыши.

Введение

В настоящее время в исследованиях белковых структур различных органов человека и животных особое внимание уделяется интегринам. Интегрины – это трансмембранные гетеродимерные белки, которые часто называют клеточными рецепторами, поскольку многие из них проявляют сродство к гликопротеидам базальной мембраны и внеклеточного матрикса [1].

Структурно данные интегриновые рецепторы состоят из одной альфа- и одной бета-субъединицы. У млекопитающих известно 19 альфа- и 8 бета-субъединиц, альтернативный сплайсинг которых позволяет создавать комбинации субъединиц, увеличивающие количество гетеродимерных белков. Для человека установлен синтез 18 альфа- и 8 бета-субъединиц, при этом каждая альфа-субъединица образует комплекс только с определённым набором бета-единиц, итогом которого является образование 24 димеров [2].

Структурное разнообразие интегринов позволяет участвовать им в функционировании различных процессов клеток. Они способны передавать различные межклеточные сигналы, от них зависит форма клетки, её подвижность, отдельные интегрины участвуют в регуляции клеточного цикла. Значительную роль интегрины выполняют в опухолевых клетках [3]. Так, установлено, что избыток экспрессии генов интегринов при меланоме, плоскоклеточном раке полости рта, носоглотки гортани или отсутствие некоторых интегринов при раке молочной

железы, раке предстательной железы, раке толстой кишки тесно связаны со степенью злокачественности опухоли [4]. В литературе имеются данные, что взаимодействие некоторых интегринов с белками внеклеточного матрикса может препятствовать апоптозу. С другой стороны, нейтрализация альфа-(ню)-бета3-интегрин антителами, напротив, способствует апоптозу. Известны работы, демонстрирующие способность интегринов функционировать как противоопухолевые препараты [5]. Удаление некоторых интегринов, например интегрин бета-1, может приводить к гибели животных [6].

Таким образом, нормальное функционирование клеток животных и человека зависит от определенного набора интегринов. Однако роль отдельных интегринов в процессах функционирования клеток изучена недостаточно.

Настоящая работа посвящена изучению роли экспрессии гена интегрин бета-2 (Itgb2) в клетках легких мыши.

Материалы и методы

В работе использовали 5–6-недельных мышей двух видов: мыши дикого типа (WT, C57BL/6), которые были получены из лаборатории Чарльза Ривера (г. Уилмингтон, США), и мыши с нокаутом гена интегрин бета-2 ($\beta 2$ integrin-deficient), которые были получены из лаборатории кафедры дерматологии и аллергических заболеваний медицинского факультета Университета Ульма (г. Баден-Вюртемберг, Германия). Животных перед экспериментами (до 7–8 недель) выдерживали в контролируемых условиях согласно принципам международных норм. Мышей содержали при температуре 23–25 °С и освещении (12/12-часовом цикле света/темноты). Коммерческие корма и воду давали по желанию. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Общее состояние мышей контролировали визуально, анализируя изменения поверхностных структур тканей и органов, а также по определению набора веса животными в течение двух недель

Для определения физиологических изменений мыши дикого типа и мыши с удаленным геном Itgb2-/- были анестезированы при помощи препарата Isofluran (Германия). Для удаления кровяных клеток из легких была выполнена перфузия через сердце с помощью натрий-фосфатного буфера (PBS).

Внутренние изменения структуры легких определяли визуально и с помощью электронного микроскопа Leica CTR 6000 (Германия). Гистологические срезы готовились по общепринятым методам [7].

Анализ функционирования клеток легких, а именно обмен кислородом и углекислым газом через дыхательные мембраны клеток, проводили методом определения парциального давления мембран клеток легких в нормальном и патологическом состоянии на приборе Flexivent (США).

Результаты и их обсуждение

Для выяснения влияния экспрессии гена интегрин бета-2 на общее морфологическое и физиологическое состояние мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 были проведены эксперименты по исследованию

Табл. 1

Характеристика весового прироста мышей дикого типа и нокаут мышей

Время эксперимента	Вес мышей различного типа, г	
	Дикий тип (WT, C57BL/6)	Нокаут Itgb2-/-
5 недель	17.6 ± 1.2	19.0 ± 1.0
6 недель	18.3 ± 1.2	19.5 ± 1.3
7 недель	19.0 ± 1.4	20.4 ± 1.5
8 недель	22.8 ± 1.5	23.0 ± 1.6

поверхностных тканей и органов животных, а также по определению динамики изменения их веса.

Из литературы известно, что нокаут генов отдельных интегринов приводит к серьезным морфологическим и физиологическим изменениям в организме человека и животного [8]. Однако результаты наших исследований показали, что как мыши дикого типа, так и мыши с нокаутом гена интегрин бета-2 (Itgb2-/-) нормально развивались, были подвижны и набирали вес (табл. 1). В поведении мышей разных групп также не было отмечено значительных изменений.

Интегрин бета-2 синтезируется в различных тканях и органах человека и животных. В качестве объекта исследования мы выбрали клетки легких, поскольку значительный процент онкологических заболеваний связан именно с данным органом.

Исследование структуры легких и легочной ткани мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 показало, что как визуально, так и гистологически они мало отличаются друг от друга. При отсутствии экспрессии интегрин бета-2 структура легких не нарушена, она имеет идеально белый цвет, что характерно для легких мышей нормального дикого типа (рис. 1). Сравнительный анализ гистологических срезов легочной ткани мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 показал отсутствие значительных различий в изучаемых образцах (рис. 2). На срезах были выявлены бронхиолы, газовые пузырьки и альвеолярные клетки. Однако выраженное количественное или качественное различие отсутствовало. Таким образом, по морфологическим показателям мыши, подвергнутые нокауту, не отличались от мышей дикого типа.

Сравнительный анализ концентрации вдыхаемого кислорода клетками мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 показал, что для мышей дикого типа данный показатель по среднеарифметическому значению был достоверно выше, чем у мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 (рис. 3). Однако по количеству выдыхаемого углекислого газа достоверного различия между мышами дикого типа и мышами с нокаутом гена интегрин бета-2 не наблюдалось (рис. 4). Таким образом, результаты экспериментов показали, что у мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 наблюдается нарушение процессов газообмена.

Заключение

Анализируя полученные нами результаты можно сказать, что отсутствие экспрессии интегрин бета-2 в легких мышей не оказывает значительного влияния на функционирование молодого организма мыши. Однако снижение потребления кислорода в 1.5–2.0 раза у мышей с нокаутом гена интегрин бета-2 приводит

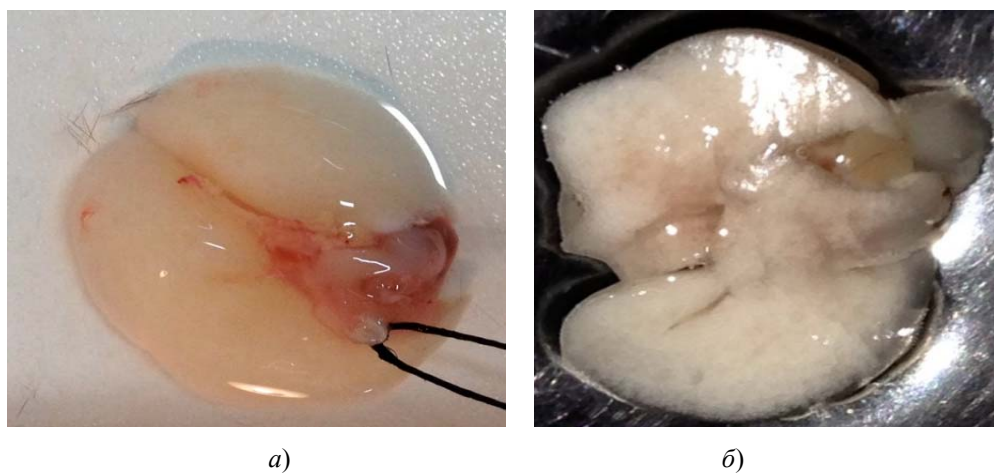


Рис. 1. Внешний вид легких мышей: а) легкие мыши дикого типа; б) легкие мыши с удаленным геном *Itgb2*^{-/-}

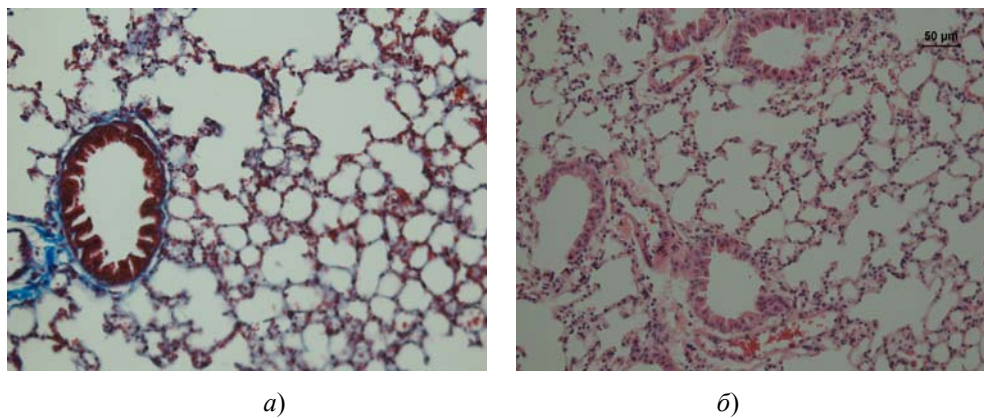


Рис. 2. Гистологические срезы легких мышей: а) легкие мыши дикого типа, б) легкие мыши с удаленным геном *Itgb2*^{-/-}

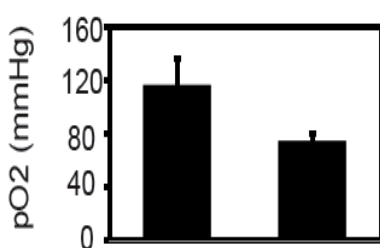


Рис. 3. Измерения потребления кислорода клетками мышей легких: 1 – мыши дикого типа (WT, C57BL/6); 2 – нокаут мыши (*Itgb2*^{-/-})*

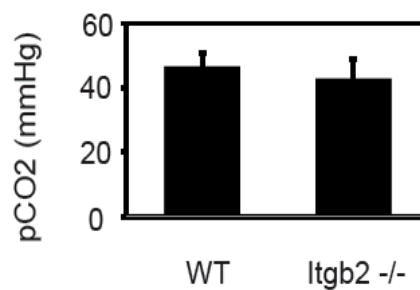


Рис. 4. Измерения выделения углекислого газа клетками мышей легких: 1 – мыши дикого типа (WT, C57BL/6); 2 – нокаут мыши (*Itgb2*^{-/-})*

*Представлены показания прибора по парциальному давлению кислорода и углекислого газа на мембрану клеток легких мыши

к количественному разобщению между процессами потребления кислорода и количеством выдыхаемого углекислого газа, что при длительном развитии организма животного может привести к возникновению необратимых изменений в клетках легкого. Нарушения газообмена в клетках легких животных могут быть обусловлены снижением проницаемости альвеолярно-капиллярных мембран для газов (диффузионная недостаточность), либо недостаточным обменом воздуха в альвеолах при их сниженной вентиляции (вентиляционная недостаточность), либо нарушением вентиляционно-перфузионных отношений. Диффузионная дыхательная недостаточность из-за значительных различий в диффузии O_2 и CO_2 через альвеолярно-капиллярные мембраны может приводить к выраженной гипоксемии, которое характерно для диффузных легочных фиброзов, гранулематозов различной этиологии и иногда наблюдается при раковом лимфангиите легких [9–11].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гена интегрина бета-2 связана с процессами дыхания клеток легких мышей, а изучаемый нами интегрин бета-2 участвует в важнейших процессах газообмена.

Литература

1. *Srichai M.B., Zent R.* Integrin Structure and Function // Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer / Eds. R. Zent, A. Pozzi. – N. Y.: Springer Science+Business Media, LLC, 2010. – P. 19–41.
2. *Hynes O.R.* Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // Cell. – 2002. – V. 110, No 6. – P. 673–687.
3. *Jin H., Varner J.* Integrins: roles in cancer development and as treatment targets // Br. J. Cancer. – 2004. – V. 90, No 3. – P. 561–565.
4. *Mercurio A.M., Bachelder R.E., Chung J., O'Connor K.L., Rabinovitz I., Shaw L.M., Tani T.* Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. – 2001. – V. 6, No 3. – P. 299–309.
5. *Kerr J.S., Slee A.M., Mousa S.A.* The α_v integrin antagonists as novel anticancer agents: an update // Expert Opin. Investig. Drugs. – 2002. – V. 11, No 2. – P. 1765–1774.
6. *Fässler R., Meyer M.* Consequences of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice // Genes Dev. – 1995. – V. 9, No 15. – P. 1896–1908.
7. *Ramos D.M., But M., Regezi J., Schmidt B.L., Atakilit A., Dang D., Ellis D., Jordan R., Li X.* Expression of integrin $\beta 6$ enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma // Matrix Biol. – 2002. – V. 21, No 3. – P. 297–307.
8. *Huang X., Wu J., Zhu W., Pytela R., Sheppard D.* Expression of the human integrin $\beta 6$ subunit in alveolar type II cells and bronchiolar epithelial cells reverses lung inflammation in $\beta 6$ knockout mice // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1998. – V. 19, No 4. – P. 636–642.
9. *Агаджанян Н.А., Елфимов А.И.* Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии. – М.: Медицина, 1986. – 272 с.
10. Вторичная тканевая гипоксия / Под ред. А.З. Колчинской. – Киев: Наукова думка, 1983. – 255 с.
11. *Лосев Н.И., Хитров Н.К., Грачев С.В.* Патофизиология гипоксических состояний и адаптации организма к гипоксии. – М.: Медицина, 1982. – 117 с.

Поступила в редакцию
08.07.13

Мухаметшина Регина Талгатовна – аспирант кафедры биотехнологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *carinobonita@mail.ru*

Мехта Адити – аспирант лаборатории эпигенетики рака легких, Институт исследований сердца и легких общества Макса Планка, г. Бад-Наухайм, Германия.

Прайснер Клаус Теодор – доктор, профессор, директор медицинского факультета, Гиссенский университет имени Юстуса Либиха, Германия.

E-mail: *klaus.t.preissner@biochemie.med.uni-giessen.de*

Баррето Гильермо – доктор, руководитель лаборатории эпигенетики рака легких, Институт исследований сердца и легких общества Макса Планка, г. Бад-Наухайм, Германия.

E-mail: *Guillermo.Barreto@mpi-bn.mpg.de*

Багаева Татьяна Вадимовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Tatiana.Bagaeva@kpfu.ru*

* * *

THE ROLE OF *Itgb2* GENE EXPRESSION IN MOUSE LUNG CELLS DURING GAS EXCHANGE

R.T. Mukhametshina, A. Mehta, K.T. Preissner, G. Barreto, T.V. Bagaeva

Abstract

The influence of gene expression of integrin *Itgb2* in mouse lung cells on the normal performance of animal respiratory cells was studied. The experiments were performed using wild-type mice (C57BL/6) and knockout mice for *Itgb2* (*Itgb2*^{-/-}). It was found that knockout mice exhibit a significant reduction in oxygen consumption compared with wild-type mice, despite the lack of any apparent morphological phenotype, both at the level of entire organism and in sections. Reduced oxygen consumption in knockout mice leads to a quantitative dissociation between the processes of oxygen consumption and the amount of exhaled carbon dioxide, which may later cause irreversible changes in lung cells. These results prove that *Itgb2* integrin is involved in pulmonary gas exchange.

Keywords: integrins, gas exchange, lungs of mouse.

References

1. Srichai M.B., Zent R. Integrin Structure and Function. *R. Zent, A. Pozzi (Eds.) Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*. N. Y., Springer Science+Business Media, LLC, 2010, pp. 19–41.
2. Hynes O.R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, vol. 110, no. 6, pp. 673–687.
3. Jin H., Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer*, 2004, vol. 90, no. 3, pp. 561–565.
4. Mercurio A.M., Bachelder R.E., Chung J., O'Connor K.L., Rabinovitz I., Shaw L.M., Tani T. Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2001, vol. 6, no. 3, pp. 299–309.
5. Kerr J.S., Slee A.M., Mousa S.A. The α_v integrin antagonists as novel anticancer agents: an update. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2002, vol. 11, no. 2, pp. 1765–1774.
6. Fässler R., Meyer M. Consequences of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice. *Genes Dev.*, 1995, vol. 9, no. 15, pp. 1896–1908.

7. Ramos D.M., But M., Regezi J., Schmidt B.L., Atakilit A., Dang D., Ellis D., Jordan R., Li X. Expression of integrin $\beta 6$ enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma. *Matrix Biol.*, 2002, vol. 21, no. 3, pp. 297–307.
8. Huang X., Wu J., Zhu W., Pytela R., Sheppard D. Expression of the human integrin $\beta 6$ subunit in alveolar type II cells and bronchiolar epithelial cells reverses lung inflammation in $\beta 6$ knockout mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1998, vol. 19, no. 4, pp. 636–642.
9. Agadzhanian N.A., Elfimov A.I. The Functions of an Organism in the Conditions of Hypoxia and Hypercapnia. Moscow, Meditsina, 1986. 272 p. (In Russian)
10. Secondary Tissue Hypoxia (Ed. by A.Z. Kolchinskya). Kiev, Naukova dumka, 1983. 255 p.
11. Losev N.I., Khitrov N.K., Grachev S.V. Pathophysiology of Hypoxic States and Adaptation of Organism to Hypoxia. Moscow, Meditsina, 1982. 117 p. (In Russian)

Received
July 8, 2013

Mukhametshina Regina Talgatovna – PhD Student, Department of Biotechnology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *carinobonita@mail.ru*

Mehta Aditi – PhD Student, Lung Cancer Epigenetics Group, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany.

Preissner Klaus Theodore – Doctor of Science, Professor, Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig University, Giessen, Germany.

E-mail: *klaus.t.preissner@biochemie.med.uni-giessen.de*

Barreto Guillermo – Doctor of Science, Head of the Lung Cancer Epigenetics Group, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany.

E-mail: *Guillermo.Barreto@mpi-bn.mpg.de*

Bagaeva Tatyana Vadimovna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Biotechnology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Tatiana.Bagaeva@kpfu.ru*