

## СИСТЕМА МИКРОТРУБОЧЕК ПРИ БАРЬЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ: ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ НА КРАЮ КЛЕТКИ И РЕОРГАНИЗАЦИЯ ВО ВНУТРЕННЕЙ ЦИТОПЛАЗМЕ

© К. М. Смурова,<sup>1</sup> А. А. Бирюкова,<sup>2</sup> А. Д. Верин,<sup>3</sup> И. Б. Алиева<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,

<sup>2</sup> Медицинский факультет, Отдел пульмонологии и неотложной медицины,  
Университет Чикаго, США, и <sup>3</sup> Центр сосудистой биологии, Медицинский Колледж Джорджии,  
Агаста, Джорджия, США; \* электронный адрес: [irina\\_alieva@belozersky.msu.ru](mailto:irina_alieva@belozersky.msu.ru)

Барьерная дисфункция эндотелиального пласта, выстилающего стенки кровеносных сосудов, связана со значительной перестройкой цитоскелета клеток, активацией актомиозинового сокращения и, в конечном итоге, с образованием промежутков между эндотелиальными клетками. В настоящее время роль микротрубочек в регуляции барьерной функции эндотелия остается невыясненной, однако ряд наблюдений позволяет предположить, что реакция со стороны микротрубочек является крайне важным звеном в развитии дисфункции эндотелия. В настоящей работе исследовали изменения, которым подвергается система микротрубочек в процессе барьерной дисфункции. В большинстве эндотелиальных клеток легочной артерии человека плотность микротрубочек наиболее высока в центре клетки, в районе centrosомы, и незначительна у клеточного края. Анализ распределения микротрубочек методом измерения интенсивности их флуоресценции после окраски специфическими антителами показал, что в норме в клетках эндотелиального пласта снижение интенсивности флуоресценции от центра клетки к ее периферии описывается уравнением экспоненциальной регрессии. Гормон тромбин (25 нМ) вызывает дисфункцию эндотелиального барьера, сопровождающуюся быстрым снижением количества периферических микротрубочек и реорганизацией системы микротрубочек во внутренней цитоплазме клетки (падение интенсивности флуоресценции описывается уравнением линейной регрессии уже через 10 мин после начала воздействия). Оба эффекта обратимы — через 60 мин после начала воздействия сеть микротрубочек не отличается от нормальной, а значит система микротрубочек способна адаптироваться к воздействию естественного регулятора тромбина. Реакция со стороны микротрубочек развивается быстрее, чем реорганизация системы актиновых филаментов, ответственных за последующие изменения формы эндотелиальной клетки в ходе дисфункции. По-видимому, микротрубочки являются первым эффекторным звеном в цепи реакций, приводящих к барьерной дисфункции эндотелия сосудов.

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

Основная функция клеток эндотелия, выстилающего внутреннюю поверхность сосудов, состоит в регуляции проницаемости васкулярной стенки, что обеспечивает обмен между циркулирующей в сосуде кровью и тканевой жидкостью. Главная роль в выполнении этой барьерной функции принадлежит цитоскелету эндотелиальной клетки, реорганизация которого приводит к изменению ее формы и является структурной основой повышения сосудистой проницаемости, характерной для целого ряда патологических состояний, таких как астма, сепсис и острая рана легкого (Garcia et al., 1995, 1996; Lum, Malik, 1996; Van Nieuw, Amerongen et al., 2000; Dudek, Garcia, 2001; Groeneveld, 2002).

Предыдущие исследования, включая и наши собственные, доказали, что нормальное функционирование эндотелиального барьера обеспечивается за счет поддержания равновесия между сокращающимися и растягивающимися силами, которые генерируются цитоскелетными белками

(Lum, Malik, 1996; Dudek, Garcia, 2001; Bogatcheva et al., 2002; Birukova et al., 2004a, 2004c). Известно, что динамическая морфология клетки в целом и эндотелиальной клетки, в частности, в значительной степени связана с кооперативной динамикой ее цитоскелетных и адгезивных структур; понимание этой кооперативной реакции имеет огромное значение и является одним из ключевых вопросов современной биологии. Клеточные системы, принимающие участие в этом процессе, включают в себя не только структурные компоненты и исполнительные механизмы (цитоскелетные фибриллы, молекулярные моторы и адгезионные рецепторы), но также регуляторные и сигнальные элементы, контролирующие динамику и взаимодействие этих структурных единиц.

Микротрубочки и актиновый цитоскелет работают кооперативно, координация их работы осуществляется на нескольких уровнях — посредством кросс-линкерных белков, которые непосредственно соединяют микротру-

бочки и актиновые филаменты (Fuchs, Karakesisoglou, 2001; Rodriguez et al., 2003; Bershadsky et al., 2006), а также посредством малых ГТФаз семейства Rho, контролирующей динамику и организацию не только актиновой системы, но и микротрубочек (Cook et al., 1998; Daub et al., 2001; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Fukata et al., 2002; Jaffe, Hall, 2005). И если участие актиновых филаментов в осуществлении барьерной функции изучалось достаточно подробно, поведение такого динамического компонента цитоскелета, как микротрубочки, исследовано далеко не полностью. Существующее положение создает значительные проблемы для практической медицины — в клинической практике существует ряд фактов, свидетельствующих о значительной роли микротрубочек в нормальном функционировании эндотелия. Например, применение некоторых антираковых препаратов, деполимеризующих микротрубочки в клетках, таких как винка-алкалоиды, приводит к внезапному развитию отека легкого у пациентов с диагнозом «рак молочной железы», и этот факт указывает на потенциальную важность нативной сети микротрубочек для регуляции проницаемости легкого (Cattan, Oberg, 1999). Лабораторные опыты позднее подтвердили клинические данные — были показаны эффект усиления проницаемости легочного эндотелия и увеличение фосфорилирования легких цепей миозина в ответ на деполимеризацию микротрубочек нокадазолом в клетках легочного эндотелия (Verin et al., 2001). В дальнейшем оказалось, что деполимеризация микротрубочек критическим образом нарушает барьерную функцию эндотелия (Birukova et al., 2004a, 2004c).

Существует ряд физиологических факторов, вызывающих быстрое повышение проницаемости эндотелиального барьера, возникающее в результате значительной перестройки цитоскелета клеток, активации актомиозинового сокращения и в конечном итоге образования промежуточных между эндотелиальными клетками. Такую барьерную дисфункцию вызывает, например, вырабатываемый организмом человека гормон тромбин (Garcia et al., 1995; Lum, Malik, 1996; Birukova et al., 2004a). Изменения, вызванные тромбином, затрагивают оба компонента цитоскелета — и актиновые филаменты, и микротрубочки. Наши предыдущие исследования, выполненные на модели эндотелиального монослоя, позволили предположить, что тромбин способен регулировать актиновый цитоскелет эндотелиальных клеток, а промежуточным звеном этой регуляции является деполимеризация микротрубочек на краю клетки (Смурова и др., 2004; Birukova et al., 2004c).

Цель настоящей работы — исследовать поведение системы микротрубочек как на краю клеток, так и во внутренней цитоплазме при барьерной дисфункции эндотелия, вызванной воздействием тромбина.

## Материал и методика

Культура клеток. Культура клеток эндотелия легочной артерии человека (НРАЕС) была получена из компании Clonetics BioWhittaker Inc. (США). Клетки выращивали на среде EGM-2 (Clonetics BioWhittaker Inc., США) при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Для экспериментов использовали клетки 6—10-го пассажей.

Экспериментальные воздействия. В экспериментах использовали тромбин (Sigma, США) в концентрации 25 нМ. Перед воздействием тромбина клетки про-

мывали бессывороточной средой и стимулировали тромбином также в среде, не содержащей сыворотки. Время инкубации с тромбином составляло 5, 10, 30 или 60 мин.

Измерение трансэндотелиального электрического сопротивления. Для характеристики барьерных возможностей эндотелия использовали высокочувствительный метод регистрации электрической проницаемости эндотелиального монослоя с помощью установки ECIS (electrical cell substrate impedance sensing system) (Applied Biophysics, Troy, NY, США). Клетки НРАЕС высевали в чашки, на дне которых располагались миниатюрные золотые электроды (площадью 10<sup>-4</sup> см<sup>2</sup>); измерение трансэндотелиального электрического сопротивления через конфлюэнтный монослой проводили по методике, описанной ранее (Verin et al., 2001; Birukova et al., 2004b).

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировали 1.5%-ным раствором глутарового альдегида (Sigma, США) на физиологическом фосфатном буфере (PBS), pH 6.8 (Sigma, США), в течение 10 мин и отмывали трехкратной сменой PBS (по 10 мин каждая смена). Фиксированные клетки пермеабелизовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 (Sigma, США) на PBS в течение 15 мин с последующей отмывкой PBS (3 раза по 10 мин). Для устранения фонового свечения перед окраской антителами клетки обрабатывали 0.2%-ным раствором боргидрида NaBH<sub>4</sub> (Sigma, США) на PBS (3 раза по 10 мин) и отмывали буфером PBS (3 раза по 10 мин).

Далее клетки инкубировали с первичными (30 мин, 37 °С), а затем со вторичными антителами (30 мин, 37 °С).

Для окраски микротрубочек в качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела к β-тубулину (INC, США; разведение 1 : 200). В качестве вторичных антител использовали антимышинные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 488 (Molecular Probes, США; разведение 1 : 100).

Покровные стекла монтировали на предметные, используя в качестве заливочной среды смесь воды и глицерина (1 : 1). Для сохранности образцов края покровных стекол заливали лаком.

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 Meta View (Universal Imaging, США), используя объектив 60×.

Разрешение полученных изображений (12 бит) составляло 9 пиксель/мкм. Обработку изображений проводили в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., США).

Для количественной оценки системы микротрубочек на периферии цитоплазмы выбирали клетки, имеющие хорошо выраженную, достаточно тонкую ламеллу. В анализируемых клетках подсчитывали все микротрубочки, пересекающие условную линию, удаленную от края в глубь клетки на расстояния 5, 10 и 20 мкм. Для подсчетов использовали только те участки, где индивидуальные микротрубочки можно было четко видеть. В качестве критерия для анализа использовали величину, равную количеству микротрубочек, пересекающих условную линию, на 1 мкм ее длины, которая является объективным показателем плотности сети, т. е. частоту микротрубочек. В единичных случаях извитые микротрубочки пересекали условную линию 2 раза и более, такие микротрубочки учитывали единожды. Полученные данные

представляли в виде графиков зависимости выбранного критерия от времени воздействия тромбина.

Состояние системы микротрубочек во внутренней цитоплазме клеток оценивали по методике, разработанной ранее (Смурова и др., 2002, 2004) с помощью программы MetaMorph (Universal Imaging, США). Методика основана на измерении интенсивности флуоресценции микротрубочек в десяти квадратных участках: от района centrosомы (1-й участок измерения) до края клетки (10-й участок измерения) на цифровых изображениях флуоресцентных препаратов клеток, полученных с помощью охлаждаемой ПЗС-камеры.

Статистическая обработка данных и построение графиков. Данные обрабатывали статистически в программах Sigma Plot 7.1 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США). Для определения достоверности различия между двумя выборками использовали *t*-критерий Стьюдента. Для построения графиков использовали программу Sigma Plot 7.1. Для аппроксимации графиков использовали программы Sigma Plot 7.1 и Table Curve 2D 5.1 (Systat Software Inc., США).

## Результаты

Система микротрубочек адаптируется к воздействию тромбина в условиях эксперимента. Ранее нами было показано, что трансэндотелиальное электрическое сопротивление, характеризующее проницаемость эндотелиального барьера, резко падает под действием тромбина, а затем постепенно восстанавливается в интервале концентраций 1—200 нМ (Birukova et al., 2004a, 2004b). Скорость и степень восстановления зависят от концентрации тромбина. Более высокие дозы приводят к необратимым нарушениям не только барьерной функции, но и жизнедеятельности эндотелиальных клеток в целом, вплоть до их гибели. При использовании 100—200 нМ тромбина восстановление электрического сопротивления происходит очень медленно (на 10 % в течение 1-го ч) и не достигает нормы за все время наблюдения (Birukova et al., 2004b).

При концентрации тромбина 50 нМ сопротивление эндотелиального пласта падает более чем вдвое по сравнению с нормой; возникающее при этом повышение проницаемости монослоя характеризует барьерную дисфункцию эндотелия (рис. 1). Нормальное электрическое сопро-

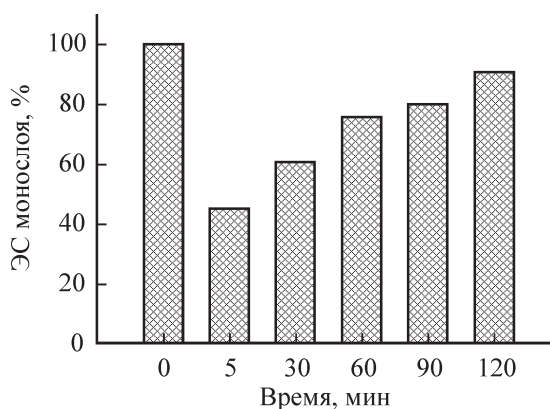


Рис. 1. Изменение электрического сопротивления (ЭС) эндотелиального пласта после воздействия 50 нМ тромбина (уровень сопротивления монослоя эндотелиальных клеток в контроле принят за 100 %).

тивление восстанавливается на 90 % в течение 1.5—2.0 ч. Таким образом, воздействие тромбина является дозозависимым и восстановление эндотелиального барьера до физиологической нормы возможно в интервале концентраций 1—50 нМ.

В данной работе используемая в экспериментах концентрация тромбина была вдвое ниже, чем максимальная для указанного интервала, т. е. 25 нМ. Концентрация была подобрана таким образом, чтобы, с одной стороны, вызывать быструю барьерную дисфункцию эндотелия, а с другой — чтобы вызванные воздействием тромбина нарушения в морфологии клеточных структур были обратимы (т. е. чтобы барьерная функция после воздействия восстанавливалась достаточно быстро). В условиях эксперимента уменьшалась площадь расплывания клеток на субстрате, нарушался цитоскелет клетки, однако все эффекты были обратимыми, через 60 мин после начала воздействия значения площадей приближались к нормальным. Таким образом, и эндотелиальные клетки в целом способны адаптироваться к воздействию естественного регулятора тромбина при использовании выбранной нами концентрации.

Воздействие тромбина приводит к уменьшению количества микротрубочек на периферии эндотелиальных клеток. В норме в клетках эндотелия легочной артерии человека линии НРАЕС методом иммунофлуоресцентного окрашивания выявляется сеть микротрубочек с выраженным центром схождения в районе centrosомы, где их плотность максимальна и не позволяет выявлять отдельные микротрубочки. По мере приближения к краю клетки плотность микротрубочек значительно понижается, что дает возможность идентифицировать в ламелле дистальные концы микротрубочек, а также значительные по длине отдельные фрагменты микротрубочек и даже индивидуальные микротрубочки целиком. В таких областях возможен подсчет микротрубочек для их количественного анализа.

Ранее мы показали, что стимуляция эндотелиальных клеток тромбином нарушает нормальную структуру системы микротрубочек в цитоплазме — относительная площадь, занимаемая микротрубочками, снижается на четверть в течение первых 10 мин обработки, а затем происходит постепенная адаптация к воздействию, в результате занимаемая микротрубочками площадь растет, приближаясь к контрольному значению через 60 мин (Смурова и др., 2004). Наиболее значительно при воздействии тромбина страдал край клетки: площадь, занимаемая периферическими микротрубочками в области 10 мкм от клеточного края, уменьшалась вдвое по сравнению с контролем. Было высказано предположение о том, что вызванное тромбином уменьшение площади, занимаемой микротрубочками, происходит за счет частичной элиминации либо укорочения периферических микротрубочек. Для проверки данного предположения в настоящей работе мы провели прямой подсчет количества микротрубочек на краю ламеллы эндотелиальных клеток в норме и после различного по времени воздействия тромбина. В качестве критерия оценки использовали количество микротрубочек, пересекающих линию стандартной длины (1 мкм), удаленную от края в глубину клетки на расстояния 5, 10 и 20 мкм.

Анализ полученных данных, представленных в виде графиков, показывает, что на периферии клетки количество микротрубочек в норме изменяется в зависимости от расстояния до наружной клеточной мембраны: на расстоянии 5 мкм от края микротрубочек в 1.5 раза меньше,

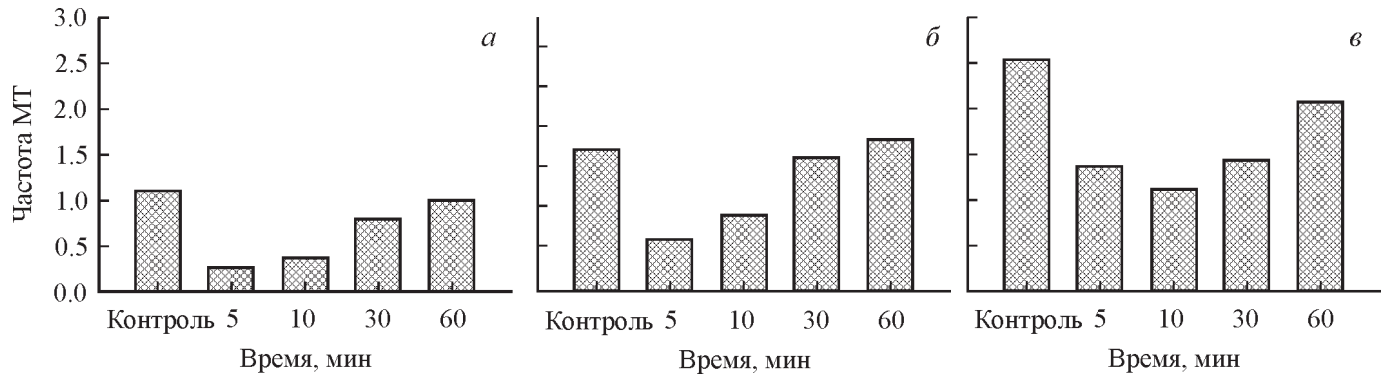


Рис. 2. Изменение частоты микротрубочек (МТ) в ламелле клеток НРАЕС на расстояниях 5 (а), 10 (б) и 20 (в) мкм от края клетки в зависимости от времени инкубации с тромбином (25 нМ).

чем на расстоянии 10 мкм, и в 2.5 раза меньше, чем на расстоянии 20 мкм (рис. 2). Количество микротрубочек в выделенных областях менялось в различной степени в зависимости от времени воздействия тромбина. В непосредственной близости от клеточного края, на расстоянии 5 мкм от наружной мембраны, через 5 мин после внесения в среду инкубации тромбина относительное количество микротрубочек снижалось в 4 раза по сравнению с нормой, и это снижение было самым значительным по сравнению с другими анализируемыми областями (рис. 2, а). По мере увеличения времени инкубации с тромбином количество микротрубочек плавно повышалось; через 60 мин число микротрубочек в данной области достигало контрольного уровня. На расстоянии 10 мкм от наружной мембраны количество микротрубочек снижалось втрое в первые минуты воздействия, далее происходило постепенное восстановление нормальной плотности микротрубочек (рис. 2, б). По мере удаления от края клетки, на расстоянии 20 мкм, в первые 5 мин воздействия тромбина происходило приблизительно двукратное снижение количества микротрубочек, которое продолжалось и в следующие 5 мин (рис. 2, в). Через 60 мин в этой области количество микротрубочек достигало 80 % от нормы, т. е. полностью не восстанавливалось.

Таким образом, наиболее сильно количество микротрубочек падало в первые 5 мин воздействия тромбина, а самым значительным было снижение количества микротрубочек в непосредственной близости от наружной мембраны клетки, в зоне 5 мкм.

Воздействие тромбина приводит к перестройке системы микротрубочек во внутренней цитоплазме эндотелиальных клеток. Поскольку плотность микротрубочек во внутренней цитоплазме эндотелиальных клеток высока, что не позволяет прямо подсчитать их, состоящие системы микротрубочек оценивали, измеряя интенсивность их флуоресценции от centrosомы до клеточного края.

Изменение оптической плотности микротрубочек в цитоплазме нативных клеток описывается экспонентой  $f(x) = ae^{-bx}$  с параметрами  $a = 287.70$  и  $b = 0.15$  (рис. 3, а), а следовательно, большая часть микротрубочек в эндотелии расходится от единого центра к периферии клетки (Смулова и др., 2007); в системе по численности доминируют связанные с centrosомой микротрубочки, а свободные микротрубочки составляют меньшинство. Таким образом, систему микротрубочек в эндотелии следует считать радиальной.

Воздействие тромбина приводит к изменению зависимости, описывающей падение оптической плотности флуоресценции, а следовательно, к перераспределению микротрубочек во внутренней цитоплазме клеток эндотелия. Через 5 мин после внесения тромбина падение плотности от centrosомы к краю клетки аппроксимируется нелинейной функцией, описываемой уравнением  $f(x) = a/(1 + e^{-(x-x_0)/b})$  (рис. 3, б), где значение  $x_0 = 4.8$ , а значения коэффициентов  $a = 246.4$  и  $b = -0.6$ . Из графика следует, что количество микротрубочек резко падает в ламелле клетки (в участках 6—10), но возрастает во внутренней цитоплазме в районах, прилежащих к centrosоме (участки измерения 2—4). Количество микротрубочек, расположенных непосредственно вокруг centrosомы, не меняется (первые столбцы графиков на рис. 3, а, б статистически не различаются).

Через 10 мин воздействия тромбина убывание оптической плотности микротрубочек описывается уравнением линейной регрессии  $f(x) = ax + b$  с коэффициентами  $a = -26.5$  и  $b = 276.5$  (рис. 3, в). Согласно проведенным нами ранее исследованиям, это означает, что в системе появляется значительное количество свободных микротрубочек (Смулова и др., 2007).

Через 60 мин после внесения тромбина в среду культивирования эндотелиальных клеток падение плотности микротрубочек от centrosомы к краю клетки описывается экспоненциальным убыванием, уравнение экспоненты имеет параметры  $a = 287.40$  и  $b = 0.19$  (рис. 3, г). Таким образом, через 60 мин после начала воздействия тромбина в системе вновь доминируют связанные с centrosомой радиально расходящиеся микротрубочки, а свободные микротрубочки составляют меньшинство. Поскольку коэффициенты  $a$  и  $b$  уравнений экспоненты в норме и в конце эксперимента практически совпадают, расположение микротрубочек во внутренней цитоплазме соответствует исходному.

Проведенный нами ранее анализ модельных систем микротрубочек (Смулова и др., 2007) позволяет трактовать полученное в результате воздействия тромбина изменение распределения оптических плотностей следующим образом. В первые 5 мин воздействия резко убывает количество микротрубочек на краю клетки, причем не только в области клеточной мембраны (что очевидно по результатам прямых подсчетов), — микротрубочки исчезают в области, ограниченной половиной радиуса клетки и ее краем, т. е. связанные с centrosомой микротрубочки во внутренней цитоплазме клетки оказываются значительно более короткими. Это возможно по двум причи-

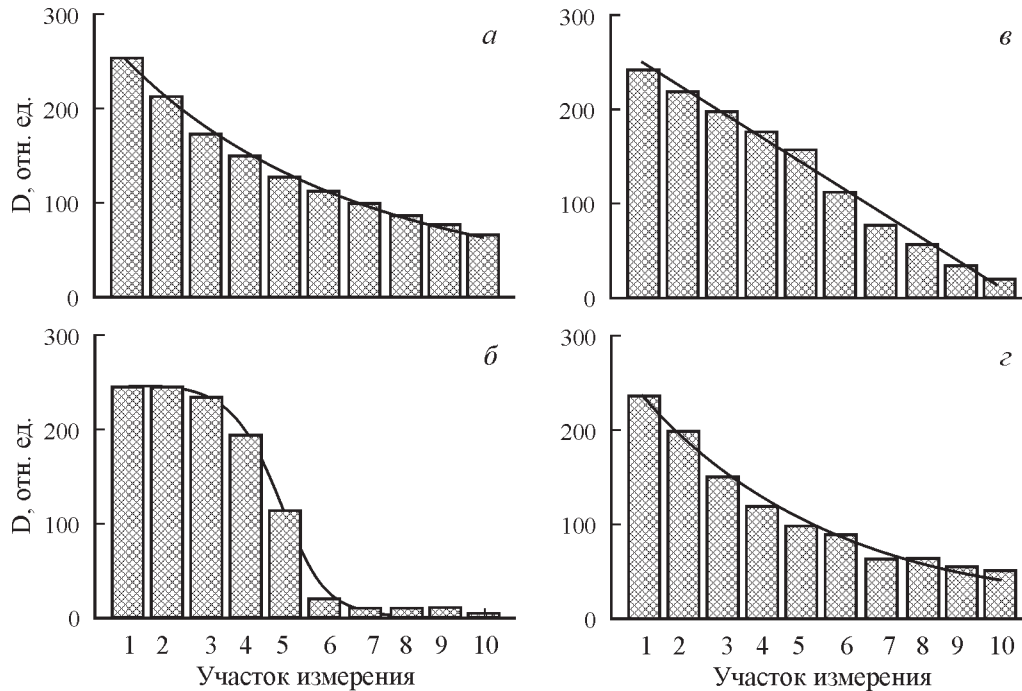


Рис. 3. Графики, описывающие падение оптической плотности ( $D$ ) микротрубочек от centrosомы к периферии культивируемых клеток НРАЕС в норме ( $a$ ) и после воздействия тромбина ( $б$ – $г$ ).

$a$  — клетки, выращенные на покровных стеклах, обрабатывали тромбином (25 нМ) в течение 5 ( $б$ ), 10 ( $в$ ) или 60 ( $г$ ) мин. По окончании воздействия клетки фиксировали и окрашивали антителами для выявления микротрубочек. Интенсивность флуоресценции микротрубочек измеряли, используя программу MetaMorph, в десяти квадратных участках от района centrosомы (1-й участок) до края клетки (10-й участок). Представлены кривые, аппроксимирующие полученные зависимости. В норме интенсивность флуоресценции микротрубочек наиболее высока в районе centrosомы и падает экспоненциально от центра клетки к ее периферии; уравнение экспоненты:  $f(x) = 287.7e^{-0.15x}$ .  $б$  — в результате воздействия тромбина через 5–10 мин характер распределения интенсивности флуоресценции изменяется, что отражает перестройку системы микротрубочек (нелинейная функция, описываемая уравнением  $f(x) = 246.4/(1 + e^{-(x-4.8)/(-0.6)})$ ).  $в$  — линейная регрессия ( $f(x) = -26.5x + 276.5$ ),  $г$  — восстановление нормального распределения через 60 мин воздействия (экспоненциальное снижение интенсивности флуоресценции ( $f(x) = 287.4e^{-0.19x}$ ), характерное для клеток эндотелия в норме).

нам: либо за счет того, что растущие от centrosомы микротрубочки не дорастают до края, либо за счет их быстрой разборки с плюс-конца по мере достижения края клетки (при отсутствии пауз и повышенной частоте катастроф на краю клетки).

Быстрые изменения затрагивают не только периферические микротрубочки, одновременно растет количество микротрубочек во внутренней цитоплазме эндотелиоцитов. Поскольку в непосредственной близости от centrosомы количество микротрубочек не меняется, по-видимому, увеличивается частота отделения минус-концов микротрубочек от centrosомы, а на освободившихся (а возможно, и включившихся резервных) заправках сразу начинается рост новых микротрубочек. Таким образом, во внутренней цитоплазме, на расстоянии до 10 мкм вокруг centrosомы, появляются свободные (по-видимому, нестабильные) минус-концы и соответственно свободные микротрубочки. Количество их через 10 мин значительно превосходит количество связанных с centrosомой микротрубочек. Возросшее количество нестабильных минус-концов, разбираясь, значительно пополняет пул растворенного тубулина и равновесие реакции постепенно сдвигается в сторону полимеризации плюс-концов. Дистальные плюс-концы микротрубочек значительно удлиняются во внутренней цитоплазме (через 10 мин воздействия оптическая плотность микротрубочек в участках 6 и 7 значительно увеличивается по сравнению с 5-минутным воздействием — рис. 3,  $б$ ,  $в$ , ее значения практически достигают нормы), но не на периферии клетки (значение

оптической плотности в участках 8–10 — рис. 2,  $в$  — остается значительно более низким, чем в норме). По мере дальнейшей полимеризации дистальных плюс-концов микротрубочек возрастает и их количество на периферии клетки, что в конечном итоге приводит к восстановлению нормальной системы микротрубочек.

## Обсуждение

Полученные в данной работе результаты позволяют заключить, что в норме система микротрубочек в эндотелиальных клетках является радиальной, а это означает, что минус-концы микротрубочек расположены на centrosоме, а плюс-концы распределены на периферии клетки в районе клеточного края. Такая организация понятна — высокая концентрация динамичных плюс-концов вблизи наружной мембраны необходима для обеспечения эффективного таргетинга клеточных контактов (Kaverina et al., 1999), запускающего целый каскад реакций на периферии клетки, связанных в том числе и с изменением ее формы (Small et al., 1999; Kaverina et al., 2002; Small, Kaverina, 2003).

Описанное нами резкое снижение количества микротрубочек в ламелле эндотелиальных клеток возможно либо за счет ограничения роста плюс-концов микротрубочек во внутренней цитоплазме (в результате растущие из центра микротрубочки не достигают края клетки), либо за счет их быстрой разборки с плюс-концов в районе клеточного края (что возможно при отсутствии пауз и повышен-

ной частоте катастроф у мембраны). В обоих случаях причиной будет изменение динамических свойств микротрубочек, и выбор в пользу одной из возможностей можно сделать, лишь проанализировав динамику микротрубочек в живых эндотелиальных клетках в условиях аналогичного эксперимента. Вызванная тромбином разборка либо укорочение периферических микротрубочек приводит к значительному уменьшению количества динамичных плюс-концов вблизи мембраны клетки, а значит, снижает частоту таргетинга и нарушает взаимосвязь фибриллярных компонентов цитоскелета клетки с ее адгезивными структурами. Если наше предположение верно, то для предотвращения дисфункции эндотелия достаточно стабилизировать микротрубочки, снизив частоту катастроф и защитив свободные плюс-концы от разборки.

Поскольку реакция со стороны актиновых филаментов и изменение площади эндотелиальных клеток развивались позднее, чем изменения в структуре сети микротрубочек (Смурова и др., 2007), можно предположить, что именно реакция микротрубочек является первым этапом барьерной дисфункции, вызванной действием тромбина, а сами микротрубочки являются первым звеном в цепи перестроек фибриллярного цитоскелета эндотелиальной клетки. Аналогичным образом при изменении формы клетки в процессе поляризации и миграции микротрубочки контролируют реорганизацию актинового цитоскелета путем дифференциальной регуляции динамики фокальных контактов (Small, Kaverina, 2003).

Принято считать, что система микротрубочек в большинстве случаев противодействует клеточной сократимости (Danowski, 1989), а разрушение микротрубочек активирует сократимость многих типов клеток (Elbaum et al., 1999; Small et al., 2002). Предполагаемый механизм подавления сократимости, возможно, связан либо с механическим противодействием микротрубочек актомиозину сокращения (Ingber, 2002; Rodriguez et al., 2003), либо с доставкой (удалением) с помощью микротрубочек сигнальных молекул, подавляющих (активирующих) миозин II. На роль такого сигнала может претендовать формин mDia, в норме ассоциированный с микротрубочками и вовлеченный во взаимодействие всех цитоскелетных структур в клетке. Белок mDia является непосредственным эффектором малой ГТФазы Rho, контролирующей динамику и организацию не только актиновой системы, но и микротрубочек (Cook et al., 1998; Daub et al., 2001; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Fukata et al., 2002). Активный mDia стимулирует полимеризацию актина и одновременно влияет на динамику плюс- и минус-концов микротрубочек (Bershadsky et al., 2006). Под действием mDia плюс-концы концентрируются около растущих фокальных контактов (Waller, Alberts, 2003; Jaffe, Hall, 2005); таким образом, mDia опосредует эффект Rho на адгезивные структуры клетки (Palazzo et al., 2001; Bershadsky et al., 2006). Белок mDia необходим для стабилизации контактов эпителиальных клеток (Sahai, Marshall, 2002).

Поскольку ведущая роль Rho-зависимых механизмов во взаимодействии микротрубочек и актинового цитоскелета при возникновении барьерной дисфункции легочного эндотелия была показана ранее (Ridley, 2001; Birukova et al., 2004c; Villalonga, Ridley, 2006), накопленные данные позволяют сформулировать следующую гипотезу. Система микротрубочек является первым эффекторным звеном в последовательности взаимосвязанных реакций: стимуляция сокращения клеточного кортекса, сопровождаемая повышением количества актиновых пучков, опо-

средована активацией Rho, которая вызывается факторами, в норме ассоциированными с микротрубочками, но высвобождающимися в цитоплазму в результате деполимеризации микротрубочек. Эффектор Rho белка mDia, ассоциированный с микротрубочками и значительно подавляющий рост их плюс-концов актинзависимым образом (Bershadsky et al., 2006), может служить в качестве такого предполагаемого фактора, отсоединяющегося от микротрубочек.

Авторы выражают благодарность проф. И. А. Воробьеву за предоставленную возможность работать с программой MetaMorph (Universal Imaging, США) и д-ру Р. Э. Узбекову за плодотворное обсуждение рукописи статьи и высказанные замечания и рекомендации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Американского Института НИИ (проекты HL067307 и HL58064) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49233).

### Список литературы

- Смурова К. М., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2002. Динамика восстановления цитоплазматических микротрубочек после их разрушения нокодазолом в клетках культуры Vero. Биол. мембраны. 19 (6) : 472—482.
- Смурова К. М., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2007. Свободные и связанные с centrosомой микротрубочки: количественный анализ и моделирование двухкомпонентной системы. Цитология. 49 (4) : 270—279.
- Смурова К. М., Бирюкова А. А., Гарсия Дж., Воробьев И. А., Алиева И. Б., Верин А. Д. 2004. Реорганизация системы микротрубочек в клетках легочного эндотелия в ответ на воздействие тромбина. Цитология. 46 (8) : 695—703.
- Bershadsky A. D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A. Y., Verkhovskiy A. B., She-mesh T., Kozlov M. M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. Eur. J. Cell Biol. 85 (3—4) : 165—173.
- Birukova A., Birukov K., Smurova K., Kaibuchi K., Alieva I., Garcia J. G., Verin A. 2004a. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. FASEB J. 18 : 1879—1890.
- Birukova A. A., Smurova K. M., Birukov K. G., Kaibuchi K., Garcia J. G., Verin A. D. 2004b. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. Microvasc. Res. 67 : 64—77.
- Birukova A., Smurova K., Birukov K., Usatyuk P., Liu F., Kaibuchi K., Ricks-Cord A., Natarajan V., Alieva I., Garcia J. G., Verin A. 2004c. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. J. Cell. Physiol. 201 : 55—70.
- Bogatcheva N. V., Garcia J. G. N., Verin A. D. 2002. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. Biochemistry. (Moscow). 67 (1) : 75—84.
- Cattan C. E., Oberg K. C. 1999. Vinorelbine tartrate-induced pulmonary edema confirmed on rechallenge. Pharmacotherapy. 19 : 992—994.
- Cook T. A., Nagasaki T., Gundersen G. G. 1998. Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. J. Cell Biol. 141 : 175—185.
- Danowski B. A. 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. J. Cell Sci. 93 : 255—266.
- Daub H., Gevaert K., Vandekerckhove J., Sobel A., Hall A. 2001. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. J. Biol. Chem. 276 : 1677—1680.
- Dudek S. M., Garcia J. G. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. J. Appl. Physiol. 91 : 1487—1500.

- Elbaum M., Chausovsky A., Levy E. T., Shtutman M., Bershadsky A. D. 1999. Microtubule involvement in regulating cell contractility and adhesion-dependent signalling: a possible mechanism for polarization of cell motility. *Biochem. Soc. Symp.* 65 : 147—172.
- Fuchs E., Karakesisoglou I. 2001. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Develop.* 15 : 1—14.
- Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell.* 109 : 873—885.
- Garcia J. G., Davis H. W., Patterson C. E. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Physiol.* 163 : 510—522.
- Garcia J. G., Verin A. D., Schaphorst K. L. 1996. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability. *Semin. Thromb. Hemostasis.* 22 : 309—315.
- Groeneveld A. B. 2002. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul. Pharmacol.* 39 : 247—256.
- Ingber D. E. 2002. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ. Res.* 91 : 877—887.
- Ishizaki T., Morishima Y., Okamoto M., Furuyashiki T., Kato T., Narumiya S. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* 3 : 8—14.
- Jaffe A. B., Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 21 : 247—269.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J. V. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* 146 : 1033—1044.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J. V. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 : 746—761.
- Lum H., Malik A. B. 1996. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74 : 787—800.
- Palazzo A. F., Cook T. A., Alberts A. S., Gundersen G. G. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3 : 723—729.
- Ridley A. J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11 : 471—477.
- Rodriguez O. C., Schaefer A. W., Mandato C. A., Forscher P., Bement W. M., Waterman-Storer C. M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 5 : 599—609.
- Sahai E., Marshall C. J. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4 : 408—415.
- Small J. V., Geiger B., Kaverina I., Bershadsky A. D. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 : 957—964.
- Small J. V., Kaverina I. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 40—47.
- Small J. V., Kaverina I., Krylyshkina O., Rottner K. 1999. Cytoskeleton cross-talk during cell motility. *FEBS Lett.* 452 : 96—99.
- Van Nieuw Amerongen G. P., van Delft S., Vermeer M. A., Col-lard J. G., van Hinsbergh V. W. 2000. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ. Res.* 87 : 335—340.
- Verin A. D., Birukova A., Wang P., Liu F., Becker P., Birukov K., Garcia J. G. 2001. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Amer. J. Physiol.* 281 : 565—574.
- Villalonga P., Ridley A. J. 2006. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors.* 24 : 159—164.
- Waller B. J., Alberts A. S. 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13 : 435—446.

Поступила 27 IV 2007

THE MICROTUBULE SYSTEM IN ENDOTHELIAL BARRIER DYSFUNCTION: DISASSEMBLY OF PERIPHERAL MICROTUBULES AND MICROTUBULES REORGANIZATION IN INTERNAL CYTOPLASM

K. M. Smurova,<sup>1</sup> A. A. Birukova,<sup>2</sup> A. D. Verin,<sup>3</sup> I. B. Alieva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> A. N. Belozersky Institute, Moscow State University, <sup>2</sup> Department of Medicine, Section of Pulmonary and Critical Care Medicine, University of Chicago, USA, and <sup>3</sup> Vascular Biology Center, Medical College of Georgia, Augusta, USA; \* e-mail: irina\_alieva@belozersky.msu.ru

Endothelial cell barrier dysfunction is often associated with dramatic cytoskeletal reorganization, activation of actomyosin contraction and finally gap formation. At present time the role of microtubules in endothelial cell barrier regulation is not fully understood, however a number of observations allow to assume that microtubules reaction is the extremely important part in development of endothelial dysfunction. These observations have been forced us to examine the role of microtubule system reorganization in endothelial cell barrier regulation. In quiescent endothelial cells microtubule density is the highest in the centrosome region and insignificant near the cell margin. The analysis of microtubules distribution after specific antibodies staining using the method of measurement of their fluorescence intensity has shown that in control endothelial cells the reduction of fluorescence intensity from the cell center to its periphery is described by the equation of an exponential regression. The hormone agent, thrombin (25 nM), causes rapid increase of endothelial cell barrier permeability accompanied by fast decrease in quantity of peripheral microtubules and reorganization of microtubule system in internal cytoplasm of endothelial cells (the decrease of fluorescence intensity is described by the equation of linear regress already through 10 min after the beginning of the treatment). Both effects are reversible — through 60 min after the beginning of the treatment the microtubule network does not differ from normal one, so the microtubule system is capable to adapt for influence of a natural regulator thrombin. The microtubules reaction develops more quickly, than reorganization of the actin filaments system, which responsible for the subsequent changes in the cell shape during barrier dysfunction. Apparently, the microtubules are the first part in a circuit of the reactions leading to the pulmonary endothelial cell barrier compromise.

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