

**ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ РНО-КИНАЗЫ
ПРИ БАРЬЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЗАВИСИТ ОТ ПРИРОДЫ ФАКТОРОВ,
ИЗМЕНЯЮЩИХ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ**

© К. М. Смуррова,¹ А. Д. Верин,² И. Б. Алиева^{1,*}

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

² Центр сосудистой биологии и Отдел пульмонологии,
Медицинский колледж Джорджии, Агаста, Джорджия, США;

* электронный адрес: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов, выполняет барьерную функцию — регулирует проницаемость сосудистой стенки, обеспечивая обмен между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью. Нарушение нормальной функции (дисфункция) эндотелия может вызываться как внутренними, так и внешними факторами. Дисфункцией эндотелия является повышение проницаемости сосудистой стенки, наблюдаемое при многих заболеваниях человека, а также возникающее как побочный эффект при лечении онкологических заболеваний препаратами, блокирующими митоз. Деполимеризация микротрубочек является первым звеном в цепи реакций, приводящих к барьерной дисфункции эндотелия, и эта стадия универсальна вне зависимости от природы фактора, провоцирующего дисфункцию. Для выработки стратегии предотвращения дисфункции в настоящей работе предполагалось выяснить, до какой стадии реакция цитоскелета эндотелиальных клеток в ходе развития барьерной дисфункции будет однотипной. Оказалось, что следующие за деполимеризацией микротрубочек этапы каскада, связанные с активностью его Rho-Rho-киназного звена, имеют особенности, зависящие от фактора, вызывающего нарушение барьерной функции. Если реакция со стороны системы актиновых микрофиламентов при подавлении активности Rho-киназы не зависит от того, какое вещество вызывало дисфункцию, то система микротрубочек реагирует на воздействия по-разному. В отличие от тромбина нокодазол на фоне подавления активности Rho-киназы оказывает более сильный эффект, максимально разрушая и динамичные, и стабильные микротрубочки. Таким образом, вне зависимости от фактора, вызывающего дисфункцию, неизменными оказываются начальные этапы дисфункции, связанные с деполимеризацией микротрубочек. Следовательно, стратегия защиты клеток эндотелия должна быть основана на использовании протекторов цитоплазматических микротрубочек, а не на влиянии на факторы, задействованные на более поздних этапах каскада, как мы предполагали ранее.

Ключевые слова: легочный эндотелий, проницаемость эндотелия, тромбин, нокодазол, Rho-киназа, актин, микротрубочки.

Эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность всех сосудов живого организма, выполняет функцию селективного барьера между кровью и внутренним пространством всех органов, таким образом принимая участие в регуляции транспорта макромолекул и перемещении клеток крови сквозь сосудистую стенку. Поддержание барьерной функции обеспечивается равновесием внутриклеточных сокращающих и растягивающих сил, генерируемых белками цитоскелета (Lum, Malik, 1996; Dudek, Garcia, 2001).

Среди множества физиологических факторов, регулирующих проницаемость эндотелия, особое место занимает тромбин — белок, образующийся на поверхности поврежденных клеток из циркулирующего в крови протротромбина и вызывающий коагуляцию крови (Bogacheva et al., 2002). Тромбин нарушает барьерную функцию эндотелия как *in vivo*, так и *in vitro*, вызывая быстрое, обратимое увеличение проницаемости эндотелиального барьера (Garcia et al., 1995; Verin et al., 2001; Birukova et al.,

2004a). Тромбин взаимодействует с рецептором PAR1 на поверхности клетки и активирует гетеротримерные G-белки, что приводит к быстрой деполимеризации микротрубочек на периферии клетки, вследствие чего активируются ГТФ-связывающий белок Rho и его эффектор Rho-киназа. Rho-киназа регулирует фосфорилирование легких цепей миозина, активируя актомиозиновые взаимодействия, что приводит к формированию стресс-фибрillard, сокращению клеток и как следствие — к дисфункции эндотелия (Birukova et al., 2004a; Смуррова и др., 2004, 2008a). Таким образом, тромбин регулирует актиновый цитоскелет эндотелиальных клеток через Rho-Rho-киназный путь, где в качестве промежуточного звена выступает деполимеризация микротрубочек, запускаемая белками, стоящими в цепи регуляторов выше Rho-киназы. В потенциальный механизм разрушения микротрубочек вовлечено опосредованное Rho-киназой фосфорилирование белка tau, являющегося регуляторным белком микротрубочек, в результате чего ассоциированный с микро-

трубочками tau диссоциирует и дестабилизирует микротрубочки (Birukova et al., 2004a).

Деполимеризация микротрубочек их специфическим ингибитором нокодазолом сама по себе вызывает дисфункцию эндотелия, и роль Rho-зависимых механизмов в этом процессе также весьма существенна — Rho-киназа является одним из ключевых эффекторов, опосредующих разрушение эндотелиального барьера в ответ на воздействие нокодазола (Смуррова и др., 2004, 2008б; Birukova et al., 2004б). Ранее мы показали, что при воздействии нокодазола опосредованная Rho активация его мишени — Rho-киназы — индуцирует фосфорилирование Rho-киназного эффектора эндотелиальных клеток, фосфатазы MLC (MYPT1, регуляторная субъединица), в положениях Thr696 и Thr850, в результате чего происходит инактивация MYPT1. Подавление фосфатазы приводит к накоплению дифосфо-MLC, который индуцирует формирование стресс-фибрилл, сжимающих клетку и провоцирующих образование межклеточных промежутков в эндотелиальном пласте (Birukova et al., 2004б). Таким образом, Rho-Rho-киназный путь является основным и в случае возникновения барьерной дисфункции, вызванной воздействием нокодазола.

Поскольку в организме человека причиной возникновения дисфункции эндотелия могут быть самые разные факторы, для выработки стратегии предотвращения дисфункции закономерен вопрос: насколько универсальны внутриклеточные реакции цитоскелета, приводящие к дисфункции эндотелия? Возможно ли выделить общие для различных агентов стадии развития барьерной дисфункции, чтобы понять, на каком этапе каскада использовать возможный универсальный протектор, который защитит эндотелиоциты вне зависимости от природы фактора, вызывающего дисфункцию? Ранее нами было показано, что деполимеризация микротрубочек происходит на самых ранних этапах дисфункции, вызванной как естественными факторами, присутствующими в организме (тромбин), так и химическими агентами синтетического происхождения (Смуррова и др., 2004, 2008а, 2008б; Birukova et al., 2004б). Экспериментальные факты позволяют предположить, что с точки зрения цитоскелетных нарушений стадии развития барьерной дисфункции, вызванной различными по природе (эндогенными либо экзогенными) факторами, схожи по крайней мере до Rho-Rho-киназного звена каскада. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы проанализировать реакцию отдельных компонентов цитоскелета — актиновой системы, динамичных и стабильных (ацетилированных) микротрубочек — и выяснить, до какой стадии с момента деполимеризации микротрубочек реакция цитоскелета эндотелиальных клеток в ходе развития барьерной дисфункции является универсальной, не зависящей от природы фактора, вызывающего изменение проницаемости эндотелия.

Материал и методика

Культура клеток. Культура клеток эндотелия легочной артерии человека (НРАЕС) была получена от компании Clonetics BioWhittaker Inc. (США). Клетки выращивали на среде EGM-2 (Clonetics BioWhittaker Inc., США) при 37 °C и 5 % CO₂. Для экспериментов использовали клетки 6—10-го пассажей.

Экспериментальные воздействия. В экспериментах использовали тромбин (Sigma, США) в концен-

трации 25 нМ. Перед воздействием тромбина клетки промывали бессывороточной средой и стимулировали тромбином также в среде, не содержащей сыворотки. Время инкубации с тромбином составляло 30 мин.

Клетки обрабатывали нокодазолом (Sigma, США) в концентрациях 100 и 200 нМ в течение 30 мин. Стоковый раствор нокодазола (10 мМ) готовили в ДМСО. Концентрация ДМСО в среде не превышала 0.1 % (v/v).

В ряде экспериментов перед стимуляцией тромбином или нокодазолом клетки предварительно обрабатывали ингибитором Rho-киназы Y27632 (Tocris, США) в концентрации 5 мкМ в течение 1 ч. Стоковый раствор Y27632 (50 мМ) растворяли в ДМСО. Концентрация ДМСО в среде не превышала 0.1 % (v/v).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировали 1.5%-ным раствором глутаральдегида (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 пермеабилизовывали 0.1%-ным раствором Triton 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 натрия NaBH₄ (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 °C), а затем вторичными антителами (30 мин, 37 °C).

Для окраски микротрубочек в качестве первичных антител использовали моноклональные мышиные антитела к β-тубулину (ICN, США) в разведении 1 : 200 и моноклональные мышиные антитела к ацетилированному тубулину (Accurate Chemicals, США) в разведении 1 : 100.

В качестве вторичных антител использовали антимышьи антитела, коньюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 488 или Alexa 594 (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 100.

Актиновые филаменты окрашивали фаллоидином, коньюгированным с флуорохромом Texas Red (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 200.

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 с объективом 60×1.4 (Nikon Intech Co., Япония). Изображения записывали на цифровую охлаждаемую ПЗС-камеру Hamamatsu ORCA-2 (Hamamatsu Photonics, Япония), управляемую программой MetaView (Universal Imaging, США).

Разрешение полученных 12-битных изображений составляло 9 пиксель/мкм. Обработку изображений проводили в программах MetaMorph (Universal Imaging, США) и Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Inc., США).

Количественная оценка системы микротрубочек и актиновых филаментов. Для количественной оценки состояния системы микротрубочек и актиновых филаментов в клетке использовали разработанные ранее методики, основанные на измерении интенсивности флуоресценции этих компонентов цитоскелета с помощью программы MetaMorph, на цифровых изображе-

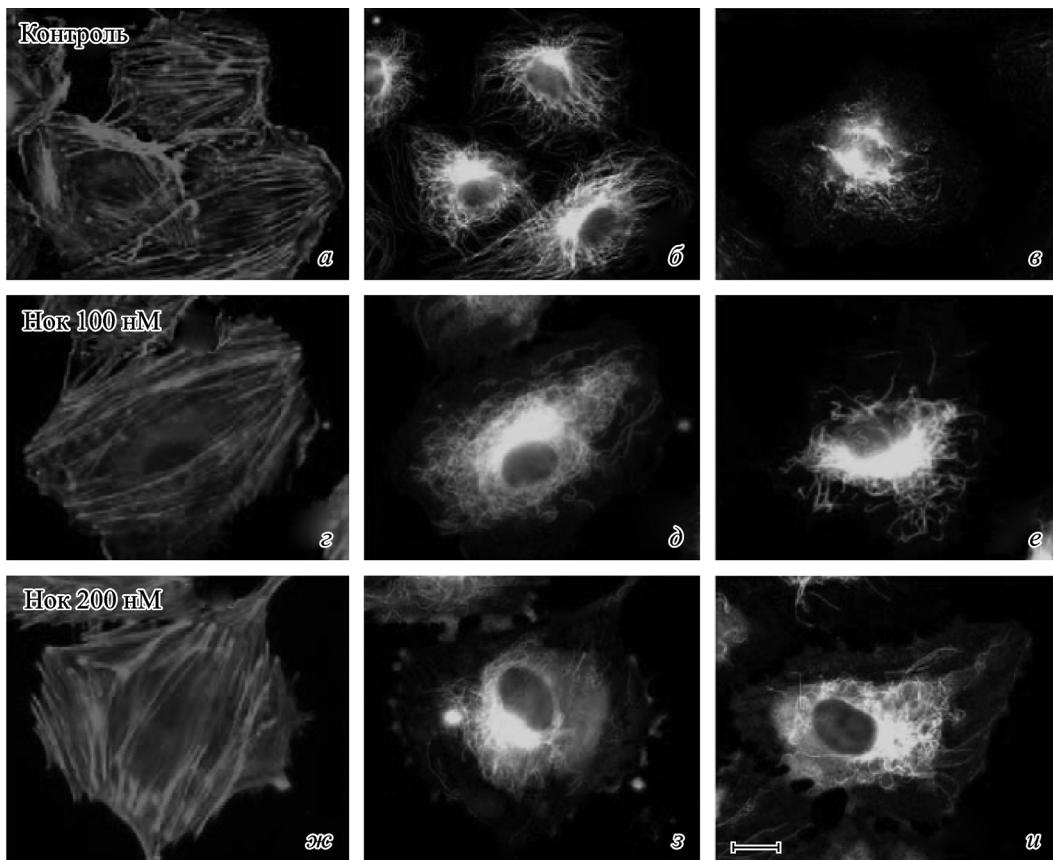


Рис. 1. Иммунофлуоресцентные микрофотографии клеток НРАЕС, интактных (*а—в*) и после воздействия нокодазола в концентрации 100 нМ (*г—е*) и 200 нМ (*ж—и*). Двойная окраска, выявляющая актиновые филаменты (левый вертикальный ряд) и микротрубочки (средний вертикальный ряд); правый вертикальный ряд — окраска, выявляющая ацетилированный тубулин. Масштабный отрезок — 20 мкм.

ниях флуоресцентных препаратов клеток (Birukova et al., 2004a, 2004b).

Статистическая обработка данных и построение графиков. Данные статистически обрабатывали в программах Sigma Plot 7.1 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США). Для определения достоверности различия между двумя выборками использовали *t*-тест (критерий Стьюдента).

Для построения графиков применяли 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 и обсуждение

Ранее было показано, что барьерную дисфункцию эндотелия могут вызывать как естественные факторы (протеаза тромбин), так и многие химические агенты, в том числе и специфические ингибиторы микротрубочек, такие как нокодазол и винblastин (Cattan, Oberg, 1999; Uoshima et al., 2001; Verin et al., 2001; Birukova et al., 2004a, 2004b). Исследования показали, что как при использовании тромбина, так и при воздействии нокодазола деполимеризация микротрубочек является одним из начальных этапов развития дисфункции, а следующие этапы связаны с Rho-зависимыми сигнальными путями (Смуррова и др., 2004, 2008а; Birukova et al., 2004a, 2004b).

Известно, что Rho-ГТФаза регулирует как актиновый цитоскелет, так и микротрубочки (Wittmann, Waterman-Storer, 2001); ингибирование Rho-ГТФазы блокирует образование стресс-фибрилл, вызванное деполимеризацией микротрубочек (Enomoto, 1996). Вместе с тем ГТФаза RhoA, активируемая белком G12/13, выступает в качестве промежуточной сигнальной молекулы при действии тромбина (Birukova et al., 2004a); активация Rho и его эффектора Rho-киназы происходит и при действии нокодазола (Verin et al., 2001).

Для того чтобы выяснить, к каким последствиям для различных компонентов цитоскелета приводит ингибирование Rho-киназы при барьерной дисфункции эндотелия, вызванной воздействием нокодазола и тромбина, в данной работе использовали Y27632 — специфический ингибитор Rho-киназы.

Изменение цитоскелета эндотелиальных клеток при воздействии ингибитора Rho-киназы Y27632. Как было описано ранее (Смуррова и др., 2004, 2008а, 2008б), в клетках эндотелия легочной артерии человека (НРАЕС) в норме выявляется сеть актиновых филаментов, состоящая из тонких пучков, расположенных в основном по периферии клетки (рис. 1, *а*). Микротрубочки расположены наиболее плотно в центре клетки, в районе центросомы, и их плотность снижается в направлении к краю клетки (рис. 1, *б*). Система микротрубочек неоднородна по химическому составу; в клетке присутствуют как динамичные, так и стабильные (ацетилированные) микротрубочки (рис. 1, *в*).

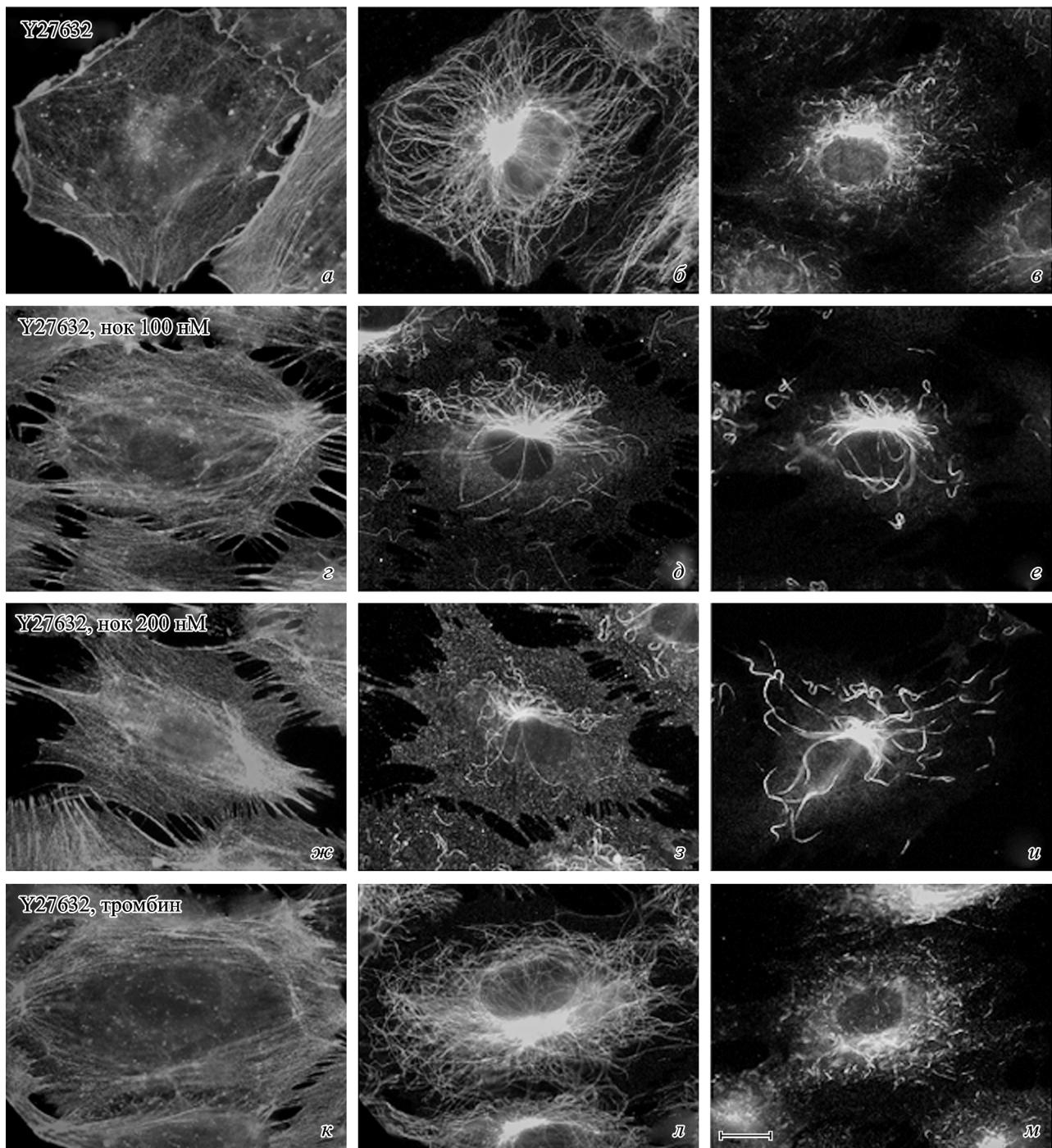


Рис. 2. Иммунофлуоресцентные микрофотографии клеток HPAEC, предварительно обработанных Y27632 (а—е), а затем стимулированных нокодазолом в концентрациях 100 (г—е) и 200 (ж—и) нМ, а также тромбином (к—м).

Двойная окраска, выявляющая актиновые филаменты (левый вертикальный ряд) и микротрубочки (средний вертикальный ряд); правый вертикальный ряд — окраска, выявляющая ацетилированный тубулин. Масштабный отрезок — 20 мкм.

Воздействие ингибитора Rho-киназы Y27632 (5 мкМ, 1 ч) приводило к резким изменениям в структуре актинового цитоскелета эндотелиальных клеток (рис. 2, а). После действия ингибитора в цитоплазме клеток практически полностью отсутствовали фибрillлярные структуры, значительная доля актина перешла в деполимеризованную форму. Система микротрубочек после действия ингибитора визуально изменилась незначительно (рис. 2, б), однако площадь, занимаемая стабильными микротрубочками, значительно уменьшилась (рис. 2, в).

Количественные измерения показали, что площадь, занимаемая стресс-фибриллами, уменьшилась в 3.5 раза по сравнению с контролем ($21.62 \pm 5.6\% , n = 20$) и составила $6.1 \pm 2.1\% (n = 15)$ от общей площади клетки (рис. 3). Плотность актина в исследуемых клетках уменьшалась от центра клетки к периферии: если в центральном участке площадь филаментов была минимальной ($4.0 \pm 2.7\%$), то в зоне 5 мкм от края она достигала $10.4 \pm 3.0\%$ от площади участка. Площадь, занимаемая микротрубочками, уменьшилась незначительно (рис. 4), однако

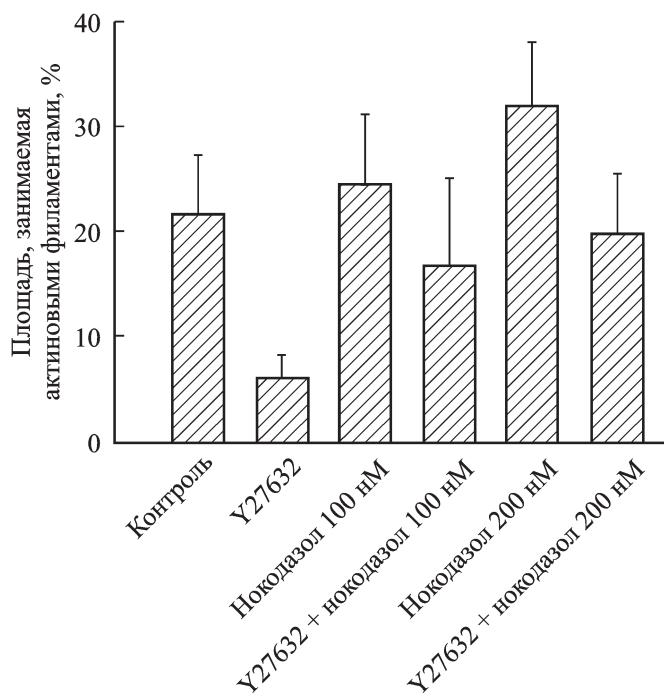


Рис. 3. Изменение количества стресс-фибрилл при воздействии ингибиторов Rho-киназы Y27632, нокодазола (100 и 200 нМ) и при воздействии нокодазола в присутствии Y27632.

действие ингибитора Rho-киназы привело к значительному, практически в 2 раза по сравнению с контролем, снижению количества стабильных микротрубочек (рис. 5).

Таким образом, действие ингибитора Rho-киназы приводило к значительному снижению количества актиновых филаментов и уменьшению количества стабильных, но не динамичных микротрубочек.

Изменение цитоскелета эндотелиальных клеток при воздействии нокодазола в присутствии Y27632. Для выяснения роли Rho-киназы в ответе цитоскелета эндотелиальных клеток на действие нокодазола в клетках ингибирировали Rho-киназу с использованием Y27632, а затем стимулировали нокодазолом в концентрациях 100 и 200 нМ в течение 30 мин (рис. 2, *г—и*). Для сравнения использовали результаты, полученные после действия нокодазола в отсутствие ингибитора Rho-киназы (рис. 1, *г—и*).

При действии нокодазола в концентрациях 100 и 200 нМ в присутствии ингибитора Rho-киназы количество полимеризованного актина увеличивается, однако количество формирующихся стресс-фибрилл несколько меньше, чем в контрольных клетках (рис. 1, *а; 2, г, ж*), и ниже значений, полученных после действия нокодазола в отсутствие ингибитора Rho-киназы (рис. 1, *г, ж*). Количественные измерения показывают, что при совместном действии нокодазола и Y27632 площадь, приходящаяся на долю полимеризованного актина, меньше количества полимеризованного актина, полученного в тех экспериментах, где воздействовали только нокодазолом (на треть, если использовали нокодазол в концентрации 100 нМ, и в 2 раза при концентрации нокодазола 200 нМ; рис. 3).

Присутствие ингибитора Rho-киназы в среде культивирования усиливает деполимеризацию микротрубочек в ответ на действие нокодазола (рис. 1, *д, з; 2, д, з*). При воздействии нокодазола в присутствии Y27632 микротру-

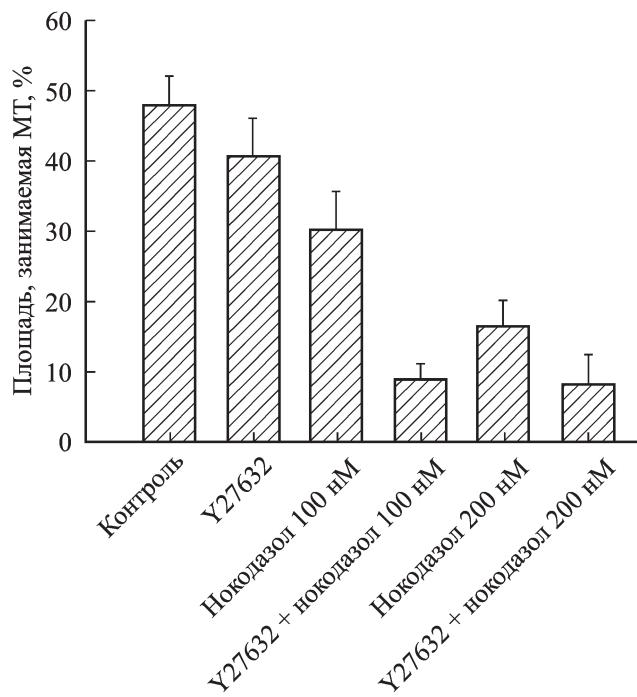


Рис. 4. Изменение количества микротрубочек при воздействии ингибитора Rho-киназы Y27632, нокодазола (100 и 200 нМ) и при воздействии нокодазола в присутствии Y27632.

бочки деполимеризуются значительно сильнее, чем в отсутствие ингибитора (рис. 4). Интересно, что в присутствии ингибитора степень деполимеризации микротрубочек одинакова как при действии нокодазола в концентрации 100 нМ, так и при действии нокодазола в концентрации 200 нМ, что, по-видимому, связано с тем, что в условиях двойного воздействия количество микротрубочек достигает минимальных значений.

Количество стабильных микротрубочек в клетке после воздействия нокодазола также значительно снижается при добавлении в среду ингибитора Rho-киназы (рис. 1, *е, и; 2, е, и; 5*). В присутствии ингибитора после воздействия нокодазола площадь, занимаемая ацетилизованными микротрубочками, была вдвое ниже, чем в экспериментах по воздействию нокодазола.

Таким образом, ингибирование Rho-киназы препятствует образованию стресс-фибрилл, которое происходит в ответ на воздействие нокодазола, однако способствует более значительному разрушению как динамичных, так и стабильных микротрубочек.

Реакция цитоскелета эндотелиальных клеток на воздействие тромбина в присутствии Y27632. Ранее нами было показано, что тромбин вызывает нарушение барьерной функции эндотелиального монослоя, сопровождавшееся формированием дополнительных стресс-фибрилл и быстрым снижением количества микротрубочек в основном на периферии клетки (рис. 6). Ингибирование Rho-киназы предотвращало вызываемое тромбином формирование стресс-фибрилл (рис. 1, *а; 2, к*). Площадь, занимаемая стресс-фибриллами в клетке, не достигала даже уровня, характерного для нативных клеток (рис. 6, *а*). Однако ингибирование Rho-киназы не предотвращало деполимеризацию микротрубочек, вызываемую тромбином (рис. 1, *б; 2, л; 6, б*). При воздействии тромбина в присутствии Y27632 площадь, занимаемая ацетилизованными микротрубочками, также

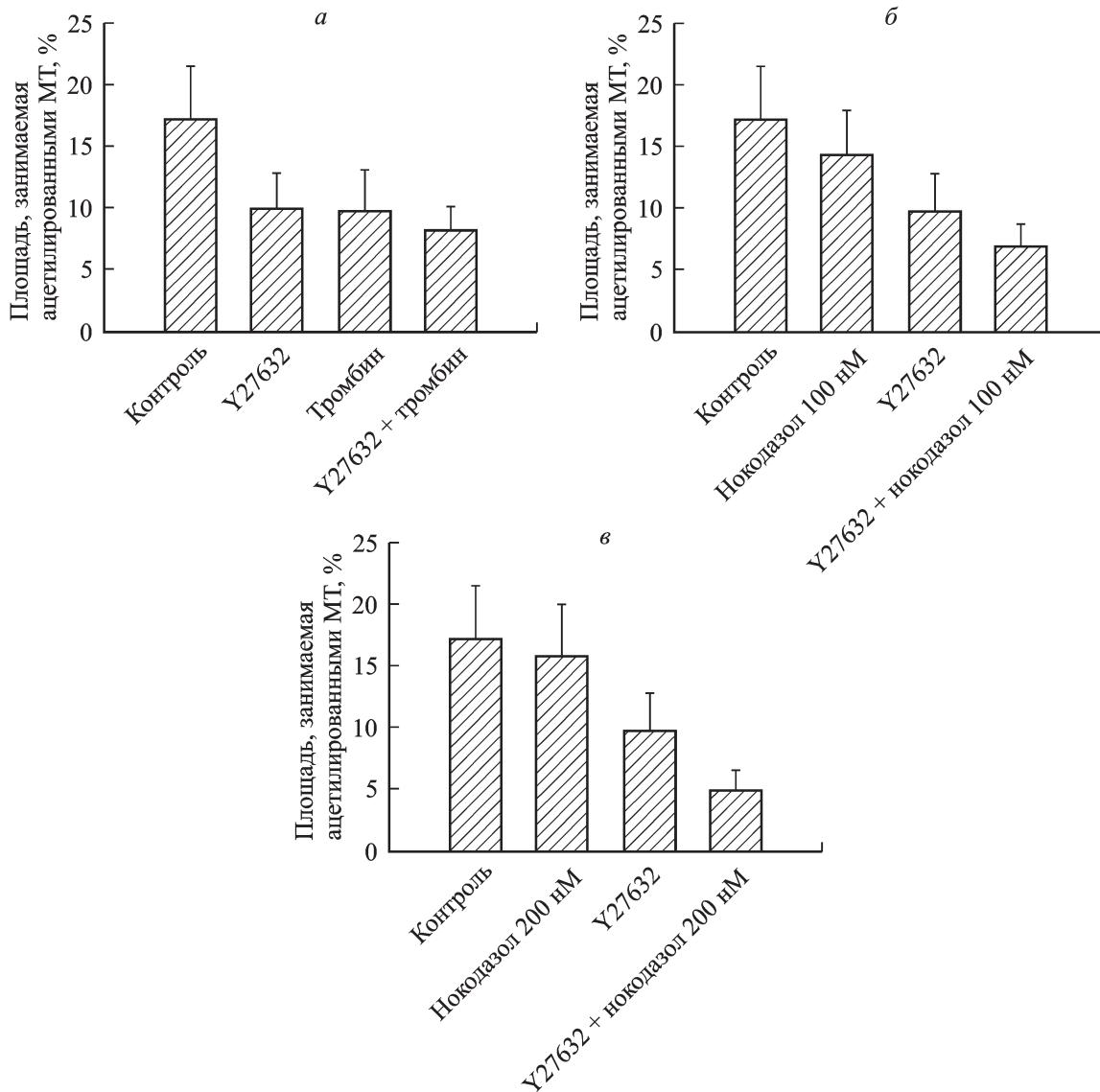


Рис. 5. Изменение количества ацетилированных микротрубочек при воздействии ингибитора Rho-киназы Y27632, тромбина, а также тромбина в присутствии Y27632 (a); при воздействии нокодазола (100 нМ), Y27632, а также нокодазола (100 нМ) в присутствии Y27632 (b); при воздействии нокодазола (200 нМ), Y27632, а также нокодазола (200 нМ) в присутствии Y27632 (c).

соответствовала значениям, характерным для воздействия только тромбина или только ингибитора Rho-киназы (рис. 1, 6; 2, 6, м; 5).

Таким образом, воздействие тромбина на фоне подавления активности Rho-киназы частично (не до исходного значения) увеличивает площадь, занятую стресс-фибрillами, тогда как на разборку динамичных и стабильных микротрубочек присутствие ингибитора Rho-киназ влияния не оказывает.

Сравнивая результаты, характеризующие изменение цитоскелетных структур под действием различных факторов, вызывающих дисфункцию эндотелия, можно заключить, что реакция актиновых филаментов не зависит от конкретного индуктора дисфункции, а ответ со стороны системы микротрубочек не является универсальным. Особенно выражена разница в реакции стабильных ацетилированных микротрубочек, по нашим предположениям, обеспечивающих устойчивость системы микротрубочек эндотелиоцитов к воздействиям (Смурова и др., 2008б). По-видимому, реакция микротрубо-

чек на воздействие нокодазола в условиях подавления активности Rho-киназы является более сложной и включает в себя не только деполимеризацию их дистальных концов, но и существенные изменения в динамических свойствах различных по стабильности микротрубочек. Таким образом, на стадиях, следующих за деполимеризацией микротрубочек, на структурных изменениях цитоскелета могут сказываться специфические эффекты, присущие конкретному веществу-индуктору дисфункции.

Анализируя в целом этапы каскада, приводящие к барьерной дисфункции, можно заключить, что вне зависимости от фактора, вызывающего дисфункцию, неизменными оказываются начальные этапы дисфункции, связанные с деполимеризацией микротрубочек. Таким образом, стратегия защиты онкологических больных от различных осложнений лечения, включая отек легких, должна быть направлена на стабилизацию цитоплазматических микротрубочек. По-видимому, этот путь будет более перспективным, чем фармакологическое воздействие на

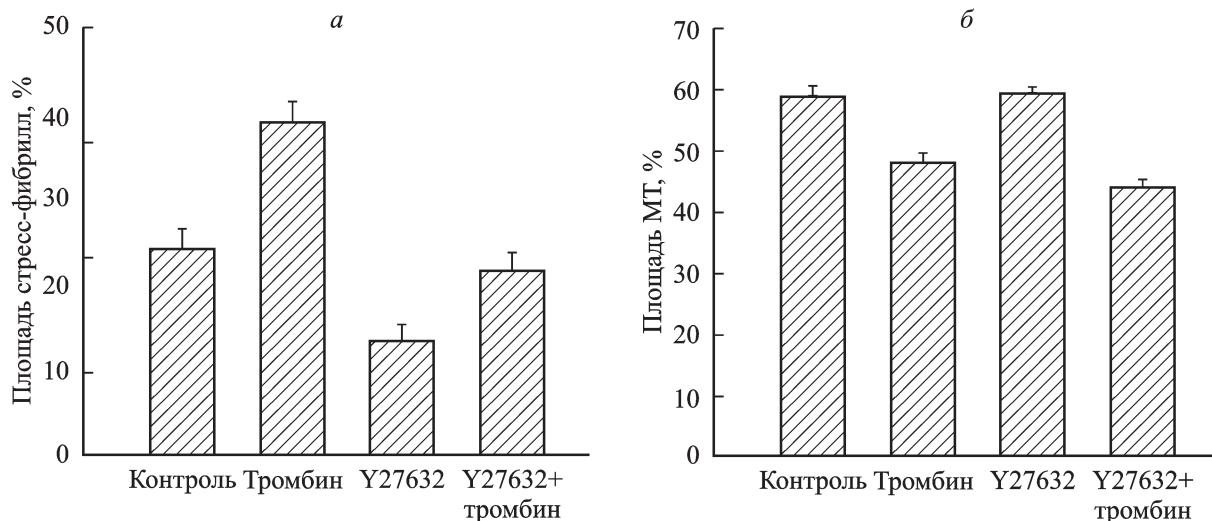


Рис. 6. Изменение количества стресс-фибрилл (а) и микротрубочек (б) при воздействии тромбина, ингибитора Rho-киназы Y27632 и воздействии тромбина в присутствии Y27632.

факторы, участвующие в более поздних этапах каскада, связанных с Rho и эффектором Rho — Rho-киназой, что мы предлагали ранее (Birukova et al., 2004b).

Исходя из полученных нами данных можно заключить, что наиболее перспективными для онкологии являются препараты, напрямую воздействующие на микротрубочки (деполимеризующие их подобно нокодазолу), но при этом не затрагивающие систему актиновых филаментов. Примером такого препарата может служить рекомендованный в качестве лекарства против рака аллицин (Hirsch et al., 2000; Oomen et al., 2004), в экспериментальных условиях подавляющий поляризацию и миграцию фибробластов (Prager-Khoutovsky et al., 2007). Вместе с тем в реальной фармакологической практике интенсивно развивающимся направлением является также и поиск противораковых препаратов, мишенью которых являются Rho-ГТФазы, поскольку эти белки являются не только ключевыми регуляторами реорганизации актинового цитоскелета, клеточной подвижности, межклеточных взаимодействий и взаимодействия клетки с внеклеточным матриксом, но и регуляторами клеточного цикла, экспрессии генов и апоптоза (Aznar et al., 2004; Fritz, Kaina, 2006; Zhang, 2006). Однако при использовании таких лекарственных средств актиновый цитоскелет будет вовлечен в общеклеточный ответ на воздействие, и, таким образом, предотвращение осложнений, связанных с дисфункцией эндотелия, при лечении больных будет по-прежнему оставаться актуальным.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Национальных институтов здоровья (National Institutes of Health, NIH, проект HL 067307) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49233 и 09-04-00363).

Список литературы

- Смурова К. М., Бирюкова А. А., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2008а. Система микротрубочек при барьерной дисфункции эндотелия: деполимеризация на краю клетки и реорганизация во внутренней цитоплазме. Цитология. 50(1) : 49—55.
- Смурова К. М., Бирюкова А. А., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2008б. Доз-зависимый эффект нокодазола на цитоскелет эндотелиальных клеток. Биол. мембранны. 25(3) : 181—190.
- Смурова К. М., Бирюкова А. А., Гарсиа 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.
- Aznar S., Fernández-Valeron P., Espina C., Laca J. C. 2004. Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. Cancer Lett. 206 : 181—191.
- Birukova A., Birukov K., Smurova K., Kaibuchi K., Alieva I., Garcia J. G., Verin A. 2004а. 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. 2004б. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. Microvasc. Res. 67 : 64—77.
- Bogatcheva N. V., Garcia J. G. N., Verin A. D. 2002. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. Biochemistry (Mosc.). 67(1) : 75—84.
- Cattan C. E., Oberg K. C. 1999. Vinorelbine tartrate-induced pulmonary edema confirmed on rechallenge. Pharmacotherapy. 19 : 992—994.
- Dudek S. M., Garcia J. G. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. J. Appl. Physiol. 91 : 1487—1500.
- Enomoto T. 1996. Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the Rho signal cascade. Cell Struct. Funct. 21 : 317—326.
- Fritz G., Kaina B. 2006. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. Curr. Cancer Drug Targets. 6 : 1—14.
- 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.
- Hirsch K., Danilenko M., Giat J., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Mirelman D., Levy J., Shiloni Y. 2000. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. Nutr. Cancer. 38 : 245—254.

- Lum H., Malik A. B. 1996. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74 : 787—800.
- Oommen S., Anto R. J., Srinivas G., Karunagaran D. 2004. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 485 : 97—103.
- Prager-Khoutorsky M., Goncharov I., Rabinkov A., Mirelman D., Geiger B., Bershadsky A. D. 2007. Allicin inhibits cell polarization, migration and division via its direct effect on microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64 : 321—337.
- Uoshima N., Yoshioka K., Tegoshi H., Wada S., Fujiwara Y., Satake N., Kasamatsu Y., Yokoh S. 2001. Acute respiratory failure caused by vinorelbine tartrate in a patient with non-small cell lung cancer. *Intern. Med.* 40 : 779—782.
- 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.
- Wittmann T., Waterman-Storer C. M. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* 114 : 3795—3803.
- Zhang B. 2006. Rho GDP dissociation inhibitors as potential targets for anticancer treatment. *Drug Resist. Updat.* 9 : 134—141.

Поступила 6 XII 2010

THE EFFECT OF RHO-KINASE INHIBITION DEPENDS ON THE NATURE OF FACTORS THAT MODIFY ENDOTHELIAL PERMEABILITY

K. M. Smurova,¹ A. D. Verin,² I. B. Alieva^{1,*}

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Russia,
and ² Vascular Biology Center and Pulmonary Division, Medical College of Georgia, Augusta, USA;
* e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Endothelium lining the inner surface of all vessels plays barrier role and regulates permeability of vascular walls controlling the exchange between circulating blood and tissue fluids. Disturbance of normal functions (endothelial dysfunction) can be caused by both internal, and external factors. Endothelial dysfunction is characterized by increased vascular wall permeability observed in many human diseases. Dysfunction is also a drug side effect of oncological diseases treatment by mitosis-blocking medications. Depolymerization of microtubules is the first step in the cascade of reactions leading to endothelial barrier dysfunction, and this stage is universal, it does not depend upon the nature of a factor provoking dysfunction. To develop the strategy of barrier dysfunction prevention, we are supposed here to find out to what stage the endothelial cell cytoskeleton reaction during the development of barrier dysfunction is universal. It has been found that the cascade stages, which follow the microtubule depolymerization and are connected with Rho-Rho-kinases activity, have the features depending on the factor provoking barrier dysfunction. Under suppression of Rho-kinase activity, the reaction of actin filaments does not depend on what substance caused dysfunction. But the microtubule system responds to the treatment varies depending on the dysfunction-provoking factor. Unlike thrombin, under the conditions of Rho-kinase activity suppression, nocodazole renders more strong effect, as much as possible destroying both dynamic, and stable microtubules. Thus, regardless of the dysfunction provoking factor, the initial stages of dysfunction connected with the depolymerization of microtubules appear to be unalterable. Consequently, endothelial cell defence strategy should be based on cytoplasmatic microtubules protectors application instead of employment of the factors involved in the cascade at later stages as we assumed earlier.

Key words: pulmonary endothelium, endothelial barrier function, thrombin, nocodazole, Rho-kinase, actin filaments, microtubules.