

РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МОНОСЛОЯ IN VITRO

© А. С. Шахов,¹ А. Д. Верин,² И. Б. Алиева^{1, 2, *}

¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Россия, и

² Центр сосудистой биологии, Регентский Университет Джорджии, Агаста, США;

* электронный адрес: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов, регулирует проницаемость сосудистой стенки, обеспечивая обмен между кровью, циркулирующей в сосудах, и тканевой жидкостью, и выполняет, таким образом, барьерную функцию. Выделенные в культуру эндотелиоциты сохраняют *in vitro* способность осуществлять барьерную функцию, присущую клеткам эндотелия сосудов *in vivo*. Эндотелиальный монослой *in vitro* является уникальной модельной системой, позволяющей исследовать взаимодействие цитоскелетных и адгезивных структур эндотелиоцитов с самых ранних этапов его формирования. В настоящей работе описаны и охарактеризованы количественно изменения цитоскелета эндотелиальных клеток от момента распластывания эндотелиоцитов на стекле и образования первых контактов между соседними клетками до формирования функционального конфлюэнтного монослоя. Основным типом промежуточных филаментов эндотелиальных клеток являются виментиновые филаменты. На разных стадиях формирования эндотелиального монослоя расположение виментиновых филаментов и их количество существенно не изменяются, они занимают более 80 % площади клетки. Система актиновых филаментов в эндотелиоцитах представлена кортикальным актином на периферии клеток и пучками актиновых стресс-фибрилл, организованных параллельно. По мере формирования контактов между клетками в нативных эндотелиальных клетках количество актиновых филаментов растет и толщина их пучков увеличивается. По мере формирования эндотелиального монослоя изменяется также и система микротрубочек — увеличивается их количество на краю клетки. На всех этапах образования эндотелиального монослоя количество микротрубочек в районе уже сформированных межклеточных контактов превышает количество микротрубочек в области свободной ламеллы клетки.

Ключевые слова: эндотелий, формирование эндотелиального монослоя, цитоскелет эндотелиальных клеток, промежуточные филаменты, актин, микротрубочки.

В настоящее время считается доказанным, что в живых клетках взаимодействие между микротрубочками, актиновыми филаментами и адгезивными структурами является ключевым событием для осуществления и регуляции многочисленных клеточных функций — миграции и локомоции, цитокинеза, поляризации клеток и межклеточных взаимодействий. Любые изменения формы клетки приводят к комплексным и сложно скоординированным изменениям клеточного цитоскелета, его фибриллярных и адгезивных структур. Широко используемой экспериментальной моделью для исследования таких взаимодействий является эндотелиальный монослой, культивируемый *in vitro* (Lum, Malik, 1996; Van Nieuw Amerongen et al., 2000; Dudek, Garcia, 2001; Bogatcheva et al., 2002; Birukova et al., 2004a, 2004b; Mehta, Malik, 2006; Komarova et al., 2007; Shivanna, Srinivas, 2009; Alieva, Verin, 2013). Эта модель уникальна: выделенные в культуру эндотелиоциты сохраняют *in vitro* способность осуществлять барьерную функцию, присущую клеткам эндотелия сосудов *in vivo*. Это позволяет изучать взаимодействие цитоскелетных и адгезивных структур при барьерной дисфункции эндотелия, вызываемой различными, в том числе и фармакологическими, агентами. Основное

внимание в экспериментальных исследованиях уделяется именно барьерной дисфункции, поскольку это патологическое состояние сосудов лежит в основе множества серьезных заболеваний человека — астмы, диабета, ишемической болезни, сепсиса и острого легочного повреждения (Garcia et al., 1995; Lum, Malik, 1996; Dudek, Garcia, 2001; Groeneveld, 2002; Komarova et al., 2007; Jalimarada et al., 2009), а также является побочным эффектом лечения онкологических заболеваний препаратами, блокирующими митоз (Cattan, Oberg, 1999; Uoshima et al., 2001; Jordan, Wilson, 2004; Pasquier et al., 2005; Schwartz, 2009). Между тем поведение структур цитоскелета и их взаимодействие с адгезивными структурами в нормальном физиологическом состоянии эндотелия практически не изучены.

Идеальным способом изучения функций любых структур клетки является исследование клеток в живом организме, в условиях *in vivo*. Однако в случае эндотелиального монослоя современное развитие техники не позволяет осуществить такое исследование в реальности, а потому модель *in vitro*, в которой клетки находятся в максимально близком к живому организму физиологическом состоянии, наиболее адекватна для таких экспериментов.

Деление клеток, образование контактов между ними и сопутствующие этому изменения цитоскелета — нормальные физиологические процессы, лежащие в основе как формирования эндотелиального монослоя, так и его репарации в случае повреждения. Эти процессы можно воспроизвести *in vitro*, используя выделенный в культуру эндотелий. Цель настоящей работы — проанализировать реорганизацию отдельных компонентов цитоскелета (промежуточных филаментов, актиновой системы и микротрубочек) и описать количественно наблюдаемые изменения цитоскелета эндотелиальных клеток, происходящие при формировании эндотелиального монослоя *in vitro*, от момента расплывания клеток на стекле и образования первых контактов между соседними клетками до формирования конфлюэнтного функционального монослоя.

Материал и методика

В работе использовали культуру клеток эндотелия легочной артерии человека (HPAEC). HPAEC — нативная культура, представляющая собой первичные клетки, выделенные из легочной артерии человека. Культура клеток HPAEC получена от компании Clonetics BioWhittaker Inc. (США). Клетки выращивали на среде EGM-2 (Clonetics BioWhittaker Inc., США) при 37 °С и 5 % CO₂. Для экспериментов использовали клетки 6—10-го пассажа.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировали двумя способами: 1) для последующего мечения антителами против β-тубулина и виментина клетки фиксировали метанолом (Sigma, США) при -20 °С; 2) для последующего мечения антителами против β-актина клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина (Sigma, США) на физиологическом фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), pH 6,8, в течение 10 мин и отмывали трехкратной сменой PBS (по 10 мин каждая). Фиксированные клетки пермеабелизовывали 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 мечением антителами клетки обрабатывали 0.2%-ным раствором боргидрида натрия NaBH₄ (Sigma, США) на PBS (3 раза по 10 мин) и отмывали PBS (3 раза по 10 мин). Далее клетки инкубировали с первыми (30 мин, 37 °С), а затем вторыми антителами (30 мин, 37 °С).

Виментиновые промежуточные филаменты метили антителами к виментину (BD Biosciences, США, разведение 1 : 200), актиновые филаменты — антителами к β-актину (Invitrogen, США, разведение 1 : 200), микротрубочки — антителами к β-тубулину (Covance, США, разведение 1 : 200). В качестве вторых антител использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 488 (Molecular Probes, США, разведение 1 : 1000), и антимышинные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Texas Red (Molecular Probes, США, разведение 1 : 1000).

Покровные стекла монтировали на предметные, используя в качестве заливочной среды Mowiol. Для сохранности образцов края покровных стекол заливали лаком.

Получение и обработка цифровых изображений. Для исследования полученных после иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов применяли

микроскоп Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss MicroImaging, Германия), оснащенный камерой AxioCam HRm. Использовали объективы 60/1.4 и 60/1.3 Plan NeoFluar и промежуточную линзу 1.6. Серии оптических срезов регистрировались с шагом 0.25 мкм по высоте. Разрешение в плоскости X/Y составляло 0.067 мкм на 1 пиксель.

Полученные изображения обрабатывали и монтировали, используя программу ImageJ (NIH).

Количественный анализ сети промежуточных и актиновых филаментов и системы микротрубочек. Количественный анализ цитоскелетных структур проводили во внутренней цитоплазме и на краю клетки — на ее периферии, где ламелла достаточно тонкая. Для характеристики стадии формирования монослоя использовали величину «протяженность контактов» между соседними клетками, имея в виду область (границу) соприкосновения клеток, имеющих соседей, друг с другом. Протяженность контактов подсчитывали следующим образом: в программе Image J (функция Measure) измеряли в пикселях длину области (границы) соприкосновения клетки с соседями и находили отношение этой величины к периметру анализируемой клетки, выражая результат в процентах.

1. Для оценки относительной площади, занимаемой виментиновыми филаментами, на цифровых изображениях обводили контур клетки, а затем область клетки, занимаемую виментиновыми филаментами, используя программу ImageJ (функция Polygon selection), и измеряли обведенные площади (функция Measure, измеряли в квадратных пикселях). Вычисляли соотношение площади, занимаемой виментиновыми филаментами, к общей площади клетки. Полученные данные экспортировали в программу Excel, с помощью которой проводили статистический анализ полученных данных и построение гистограмм.

2. Для количественного анализа изменений в системе актиновых филаментов использовали следующие параметры: относительную площадь, занимаемую актиновыми филаментами, толщину актиновых фибрилл и относительную длину актиновых фибрилл. Для оценки относительной площади на цифровых изображениях обводили контур клетки, а затем область клетки, занимаемую актиновыми филаментами, используя программу ImageJ (функция Polygon selection), и измеряли обведенные площади (функция Measure). Вычисляли соотношение площади, занимаемой актиновыми филаментами, к общей площади клетки. Полученные данные экспортировали в программу Excel для статистического анализа данных и построения гистограмм.

Для измерения толщины актиновых фибрилл на цифровых изображениях клеток в программе ImageJ проводили линию перпендикулярно длинной оси актиновой фибриллы, длина полученной линии соответствовала толщине актиновой фибриллы в месте измерения. Для каждой исследованной клетки толщину актиновой фибриллы вычисляли как среднее из 30 измерений.

Относительную длину актиновых фибрилл на цифровых изображениях клеток вычисляли следующим образом. Выбирали фибриллу и измеряли ее длину в программе Image J, используя функцию Measure. Затем продлевали линию, вдоль которой располагалась фибрилла, до пересечения с границами клетки и вычисляли ее длину. Отрезок, полученный между точками пересечения линии, вдоль которой располагалась фибрилла, и границами клетки, отражает максимальную длину, которую фибрил-

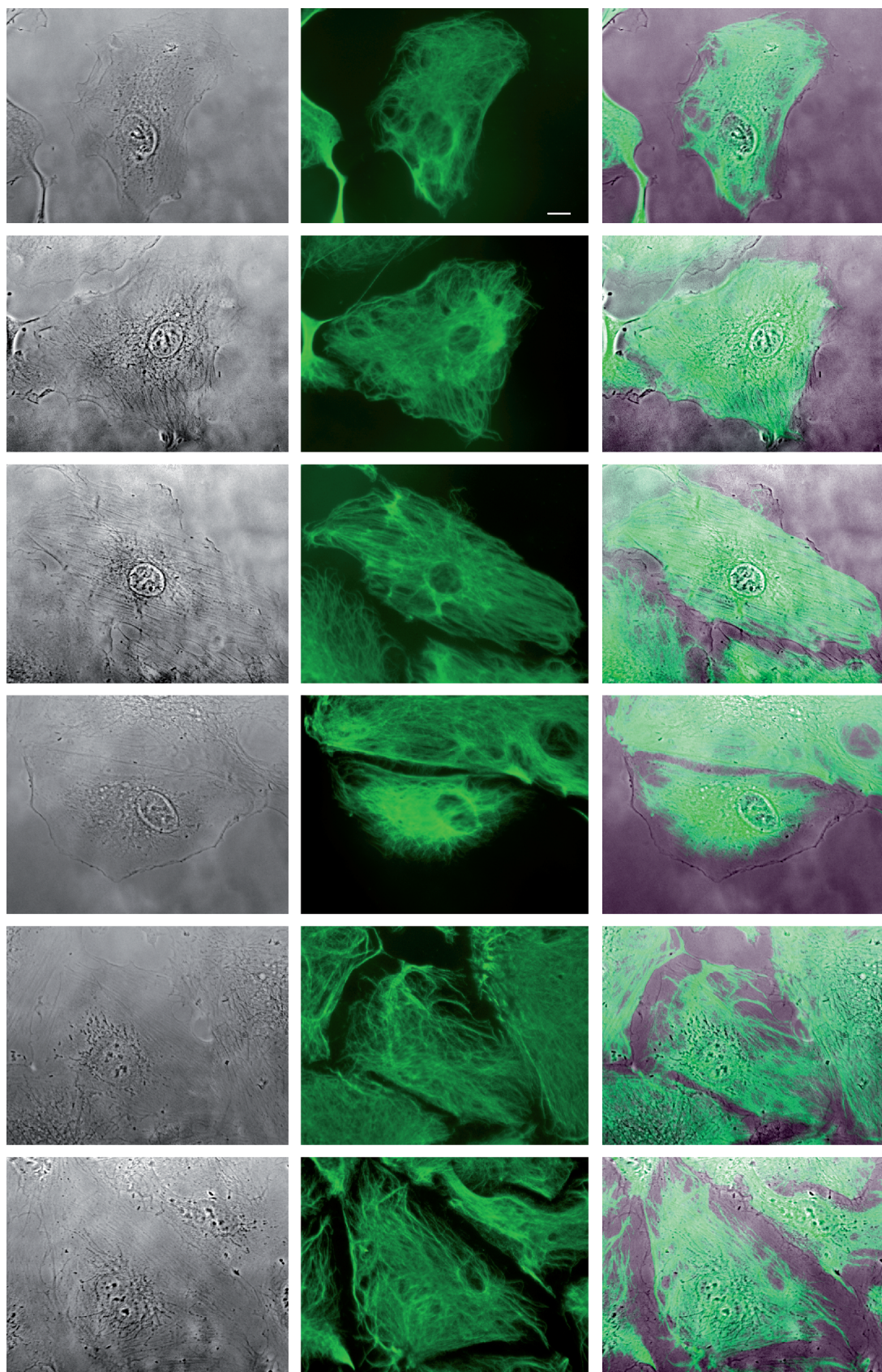


Рис. 1. Виментиновые филаменты в эндотелиальных клетках НРАЕС на разных стадиях формирования моноослой. Виментиновые филаменты занимают практически одинаковую площадь в клетках, имеющих разную протяженность контактов с соседними. *Левый вертикальный ряд* — фазово-контрастные микрофотографии; *средний вертикальный ряд* — иммунофлуоресценция, выявление виментина с помощью соответствующих антител; *правый вертикальный ряд* — наложение фазово-контрастных и иммунофлуоресцентных изображений. *Масштабный отрезок* — 10 мкм.

ла потенциально могла бы занимать в клетке. Отношение этого отрезка к реальной длине актиновой фибриллы (относительная длина актиновых фибрилл), выраженное в процентах, отражает собственный потенциал роста фибриллы.

3. Для анализа изменений в системе микротрубочек в программе ImageJ подсчитывали количество концов микротрубочек в районе свободной клеточной ламеллы и в районе адгезивных контактов. Измерения проводили на участках длиной 10 мкм и шириной 2 мкм. Использовали два способа измерения. В первом случае, когда микротрубочки были хорошо различимы визуально (на краю ламеллы, где слой цитоплазмы достаточно тонкий), их рассчитывали напрямую. Во втором случае, когда плотность расположения микротрубочек не позволяла точно идентифицировать их концы, в программе ImageJ подсчитывали количество микротрубочек по пикам их флуоресценции на цифровых изображениях. На отрезке длиной 10 и шириной 2 мкм выявлялись пики флуоресценции, лежащие выше измеренного в данном участке значения фона и соответствующие положению микротрубочек в данной области клетки. Для анализа количества микротрубочек учитывали пики флуоресценции, превышающие уровень фона на 25 % и более.

Данные обрабатывали статистически в программе Sigma Plot 11.0 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США). Для определения достоверности различий между анализируемыми выборками использовали *t*-тест (критерий Стьюдента), а также непараметрический *U*-test (критерий Уилкоксона—Манна—Уитни).

Результаты

Анализ расположения виментиновых филаментов в клетках культуры НРАЕС на разных стадиях формирования монослоя. Согласно данным литературы, основным типом промежуточных филаментов эндотелиальных клеток являются виментиновые филаменты (Bruneel et al., 2003; Liu et al., 2010). В клетках культуры НРАЕС методом иммунофлуоресцентного анализа выявляется интенсивно развитая сеть виментиновых промежуточных филаментов. Виментиновые филаменты располагаются диффузно по всей цитоплазме, исключая краевые области клетки в тех районах, где ламелла достаточно тонкая (рис. 1). Филаменты на краю эндотелиоцитов отсутствуют как в одиночных клетках различной формы (от фибробластоподобной до полигональной), так и в клетках, имеющих соседей (вне зависимости от протяженности контактов — от одиночных клеток до клеток, растущих в монослое). Причем свободный от виментиновых филаментов край клетки наблюдается не только у клеток, имеющих свободную ламеллу, но и в районе контакта с соседней клеткой. Выраженные центры схождения виментиновых филаментов в эндотелиоцитах отсутствуют.

Расположение виментина в цитоплазме клетки практически не меняется по мере образования эндотелиального монослоя *in vitro*. В области ядра в клетках, имеющих участки свободной ламеллы (с протяженностью контактов 1—10, 10—30 и 30—50 %), может наблюдаться большая плотность расположения виментиновых филаментов, что обусловлено большей толщиной цитоплазмы в данном районе клетки. В клетках с протяженностью контак-

тов 50—70 % от периметра клетки, а также в клетках с практически сформировавшимися клеточными контактами (70—100 %) виментиновые филаменты располагаются более равномерно.

Для того чтобы установить, изменяется ли площадь, занимаемая виментиновыми филаментами в цитоплазме клетки по мере образования эндотелиального монослоя, вычисляли соотношение площади, занимаемой виментиновыми филаментами, к площади клетки (рис. 2). Оказалось, что виментиновые филаменты занимают практически одинаковую площадь в клетках, имеющих разную протяженность контактов с соседями. Статистически значимые различия наблюдались только между одиночными клетками и клетками, имеющими наибольшую протяженность контактов (50—70 и 70—100 %), что обусловлено отсутствием у последних краевых областей очень тонкой ламеллы. Таким образом, распределение виментиновых филаментов в цитоплазме эндотелиоцитов в процессе формирования монослоя принципиально не изменяется, наблюдаемые различия обусловлены изменением толщины клетки.

Анализ системы актиновых филаментов в клетках культуры НРАЕС на разных стадиях формирования монослоя. Эндотелиальные клетки линий НРАЕС имеют хорошо развитую систему актиновых филаментов. Согласно данным литературных источников, для эндотелиоцитов характерны три вида структур цитоскелета, формируемых актином, — мембранный скелет, кортикальная актиновая сеть и стресс-фибриллы, сформированные из пучков актиновых филаментов (Prasain, Stevens, 2009). Для целей настоящего исследования методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием антител против β -актина в эндотелиоцитах выявляли кортикальную актиновую сеть и пучки актиновых фибрилл.

Анализ проводили для одиночных клеток и клеток с разной протяженностью контактов, вплоть до формирования конфлюэнтного монослоя. Оказалось, что в одиночных клетках и клетках с небольшой протяженностью контактов присутствует кортикальная сеть актиновых филаментов, т. е. кортикальная сеть наблюдается в тех областях ламеллы, где контакт с соседней клеткой еще не установлен. По мере нарастания зоны соприкосновения

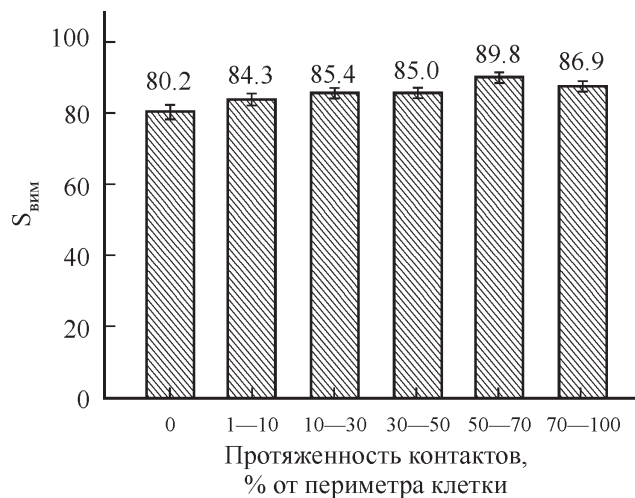


Рис. 2. Зависимость площади, занимаемой виментиновыми филаментами ($S_{\text{вим}}$) в клетках культуры НРАЕС, от протяженности контактов с соседними клетками.

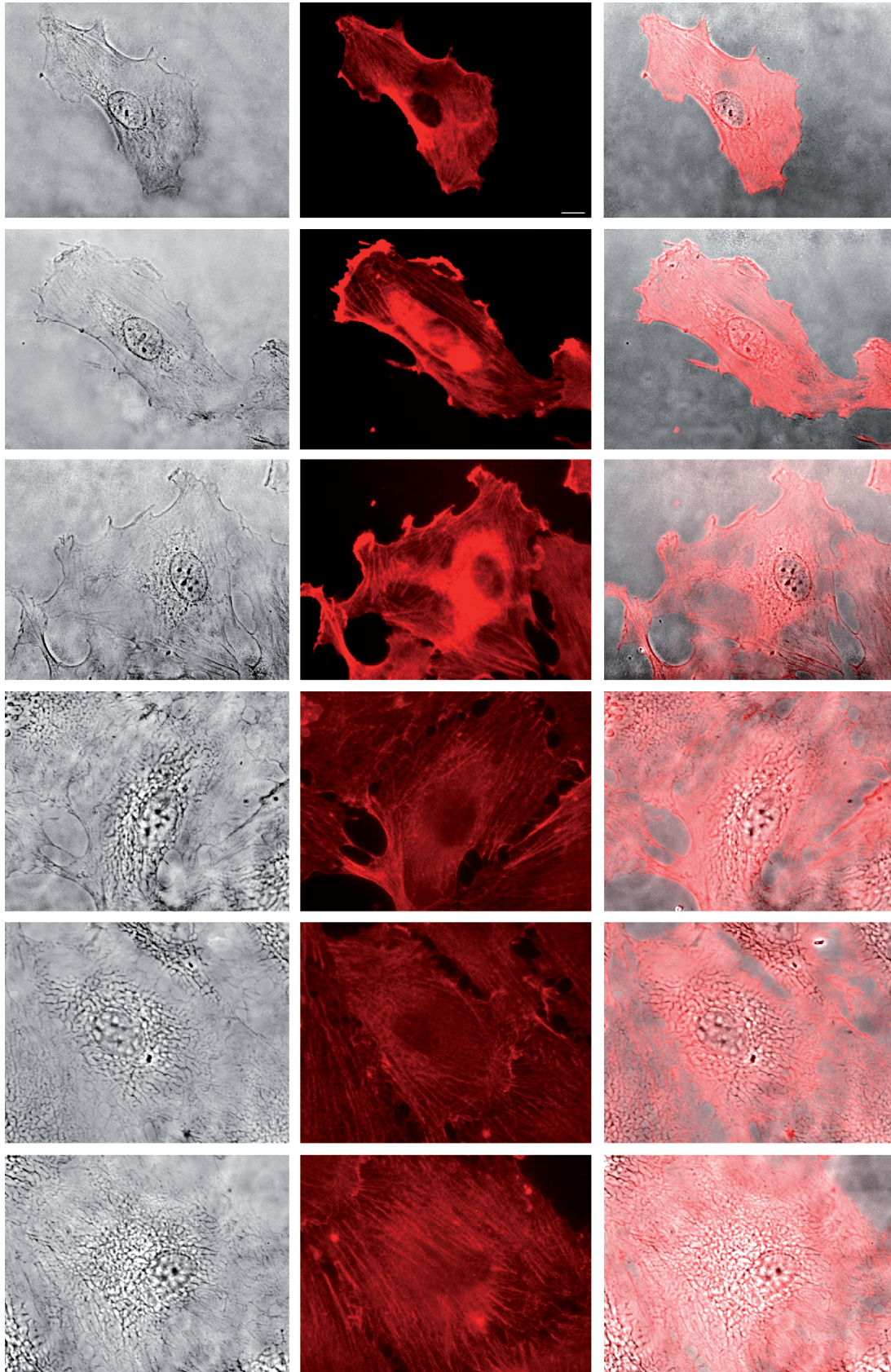


Рис. 3. Актин в клетках НРАЕС на разных стадиях формирования монослоя.

Левый вертикальный ряд — фазово-контрастные микрофотографии; средний ряд — иммунофлуоресценция, выявление актина с помощью соответствующих антител; правый ряд — наложение фазово-контрастных и иммунофлуоресцентных изображений. Масштабный отрезок — 10 мкм.

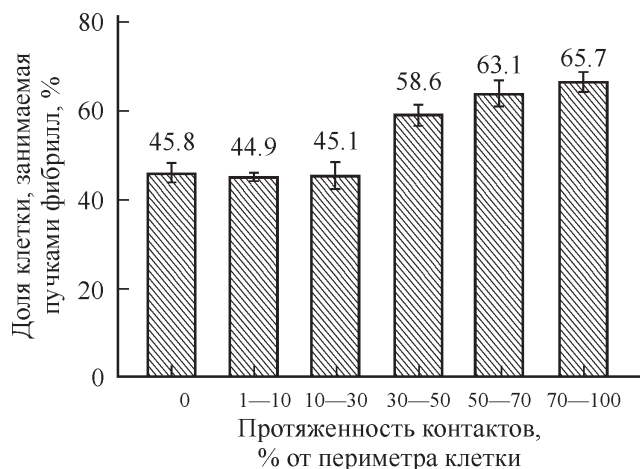


Рис. 4. Зависимость изменения площади, занимаемой актиновыми филаментами в клетках культуры НРАЕС, от протяженности контактов с соседними клетками.

одной клетки с другой (соседней) кортикальная сеть исчезает. Кортикального актина на периферии не наблюдается в клетках с протяженностью контактов свыше 50 %.

Система актиновых филаментов характерна для эндотелиальных клеток с любой протяженностью контактов (рис. 3). Пучки актиновых фибрилл располагаются преимущественно вдоль длинной оси клетки, их количество визуально увеличивается по мере формирования монослоя.

Для количественной оценки возможных изменений в системе актиновых филаментов по мере формирования эндотелиального монослоя анализировали общую площадь, занимаемую актиновыми фибриллами, по отношению к площади клетки (рис. 4), толщину фибрилл, а также их длину (рис. 5).

Для клеток культуры НРАЕС соотношение площади, занимаемой актиновыми пучками, к общей площади клетки оказалось одинаковым для одиночных клеток и клеток с протяженностью контактов 1—30 % и составляло 44.9—45.8 % (рис. 4). В то же время для клеток с большей протяженностью контактов этот параметр превышал 58.6 %. Статистически значимые различия наблюдались между группами клеток с протяженностью контактов до 30 % и более 30. Таким образом, в клетках с протяженностью контактов больше 30 % актиновые пучки занимали большую площадь, и разница в площадях, занимаемых актиновыми пучками, достигала 20 %.

Анализ толщины актиновых фибрилл в клетках НРАЕС показал, что в одиночных клетках толщина фибрилл меньше, чем в клетках с большой протяженностью контактов с соседними клетками (70—100 %) (рис. 5, а). В клетках, образующих монослой, толщина фибрилл увеличивается до 0.70 мкм по сравнению с 0.54 мкм, полученными для одиночных клеток (различие статистически достоверно).

Анализ относительной длины актиновых фибрилл в эндотелиоцитах проводили, как описано в разделе «Материал и методика». Относительную длину актиновых фибрилл в клетке измеряли как соотношение длины существующей актиновой фибриллы к потенциально возможной ее длине, ограниченной краями клетки (т. е. к расстоянию между границами клетки на линии расположения фибриллы). Результаты проведенного анализа показали

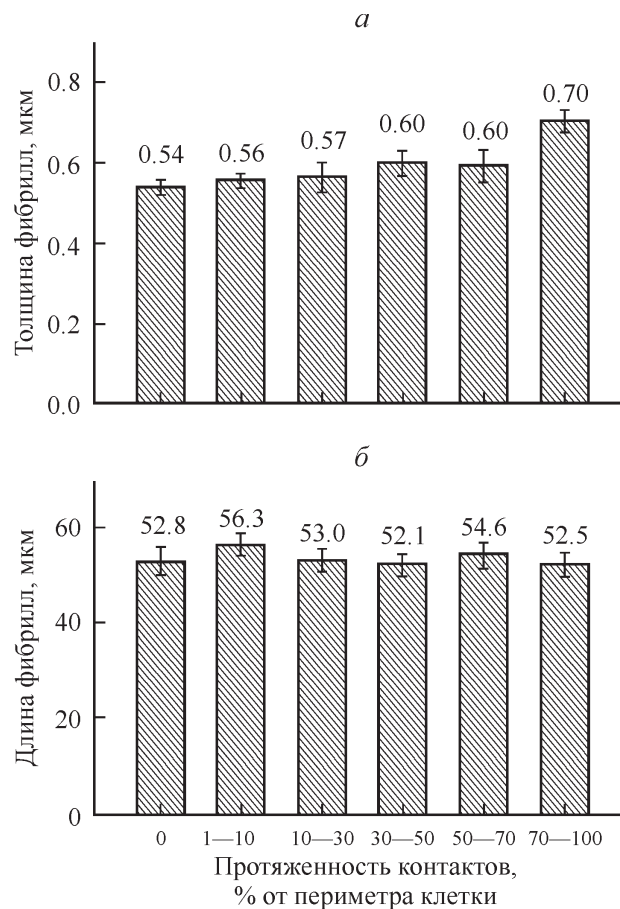


Рис. 5. Изменение толщины (а) и длины (б) актиновых фибрилл в клетках культуры НРАЕС, имеющих различную протяженность контактов с соседними клетками.

(рис. 5, б), что в клетках культуры НРАЕС относительная длина фибрилл не увеличивается и составляет около половины потенциально возможной длины — 52.1—56.3 % (статистически значимые различия отсутствуют). Таким образом, относительная длина фибрилл в эндотелиоцитах не изменяется по мере формирования контактов между соседними клетками.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что система актиновых филаментов в клетках культуры НРАЕС по мере формирования эндотелиального монослоя изменяется незначительно: когда протяженность контактов эндотелиоцита с соседними клетками превышает треть его периметра, увеличивается общая площадь, занимаемая актиновыми пучками. При этом относительная длина актиновых фибрилл не изменяется, а толщина увеличивается.

Анализ изменений системы микротрубочек, происходящих при формировании монослоя в клетках культуры НРАЕС. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против β -тубулина показало, что система микротрубочек клеток культуры НРАЕС имеет выраженный центр схождения вблизи ядра, в районе centrosомы. В этой области интенсивность флуоресценции (а следовательно, и плотность) микротрубочек максимальна, она постепенно снижается от centrosомы к клеточным краям (рис. 6). На периферии клетки плотность микротрубочек довольно низкая — можно легко идентифицировать отдельные микротрубочеч-

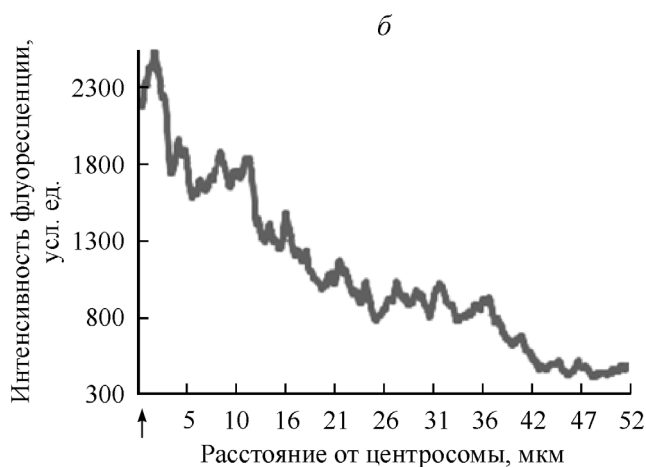
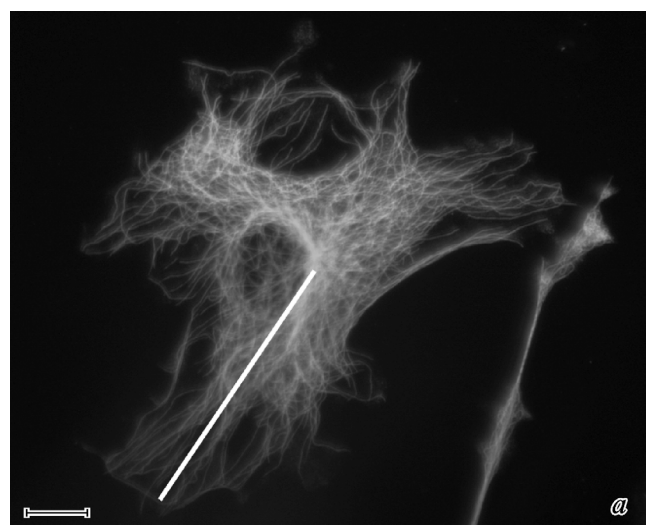


Рис. 6. Измерение интенсивности флуоресценции микротрубочек, расположенных в области между клеточным центром и ламеллой клетки.

а — иммунофлуоресцентная микрофотография клетки НРАЕС; белым цветом обозначен отрезок, вдоль которого проводили измерения. *б* — изменение интенсивности флуоресценции от centrosомы (ее положение обозначено линией) до края клетки. Масштабный отрезок — 10 мкм.

ки или их достаточно протяженные дистальные фрагменты. Таким образом, в эндотелиоцитах линии НРАЕС система микротрубочек является радиальной — большая часть их растет от centrosомы.

Для проведения количественного анализа выделили 6 групп клеток: одиночные клетки и 5 групп клеток, имеющих разную протяженность контактов с соседями: 1—10, 10—30, 30—50, 50—70 и 70—100 % от длины собственного периметра клетки. Анализировали микротрубочки в области свободной ламеллы и в районе контактов с соседней клеткой.

У одиночных клеток, не имевших контактов с соседями, форма клетки варьировала от идеально круглой до сильно вытянутой, фибробластоподобной, со множеством длинных выростов ламеллы. Радиальная составляющая наблюдалась во всех одиночных клетках вне зависимости от их формы (рис. 7). В вытянутых и фибробластоподобных клетках наблюдались выраженные параллельные пучки микротрубочек, ориентированные вдоль их длинной оси. Аналогичные параллельно орга-

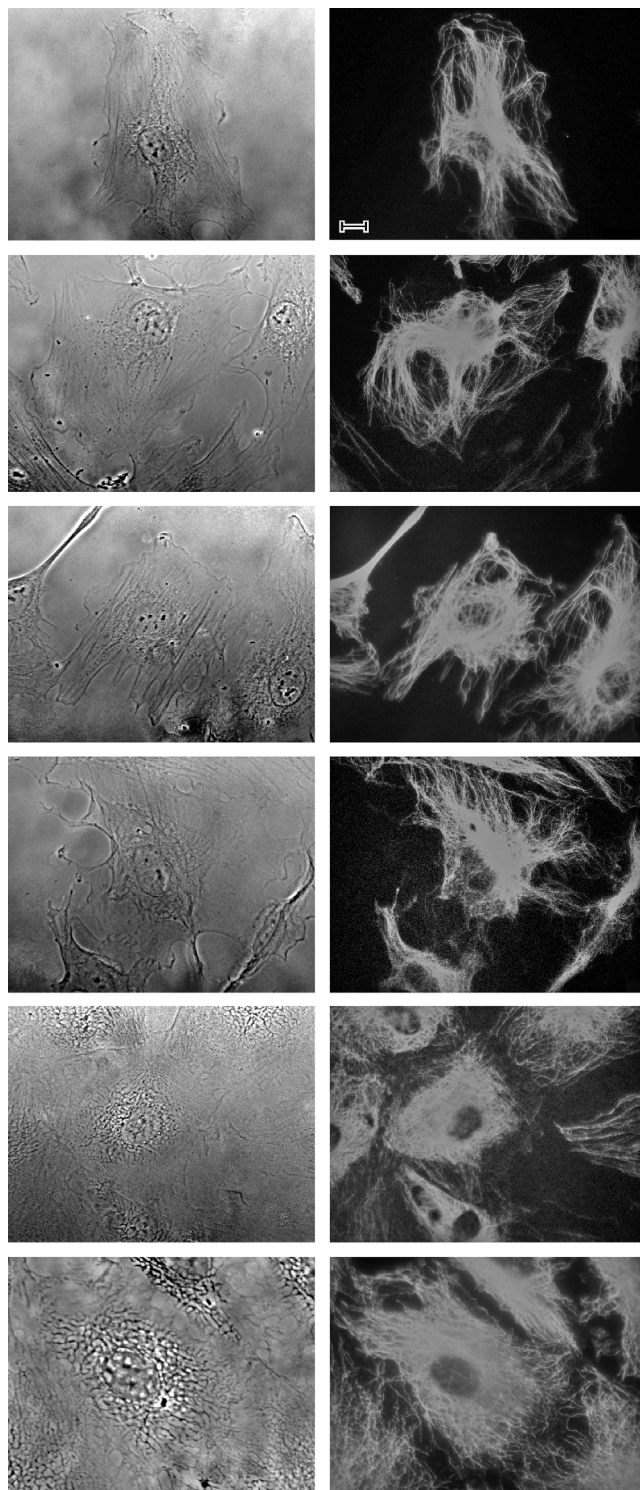


Рис. 7. Система микротрубочек в клетках НРАЕС на разных стадиях формирования монослоя.

По мере формирования монослоя эндотелиоцитов количество микротрубочек в цитоплазме визуально увеличивается. Слева — фазово-контрастные микрофотографии, справа — иммунофлуоресценция, мечение антителами против β-тубулина. Масштабный отрезок — 10 мкм.

низованные пучки микротрубочек имели и клетки с незначительной протяженностью контактов с соседями (1—10 %), однако в клетках с большей протяженностью контактов такие пучки не выявлялись (рис. 7).

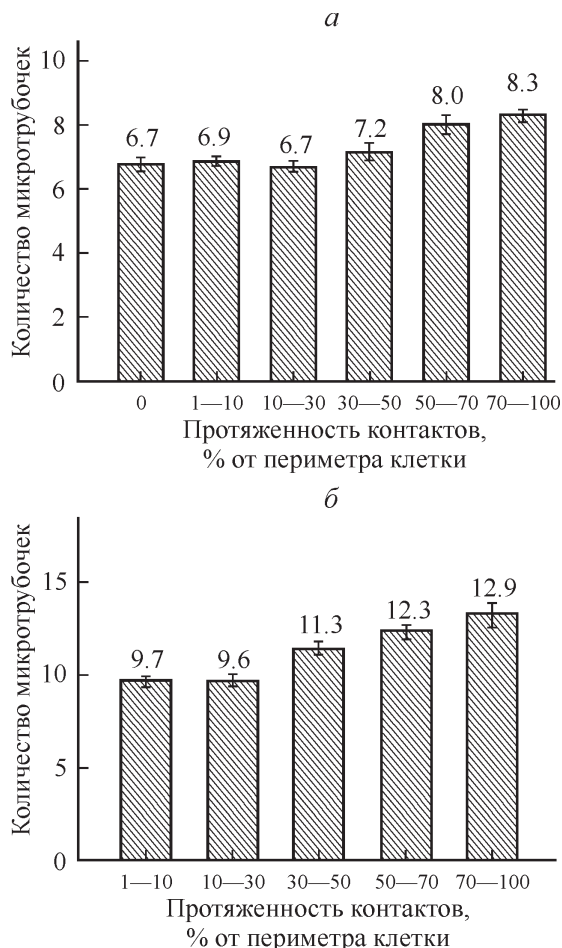


Рис. 8. Изменение количества микротрубочек в клетках культуры НРАЕС, имеющих различную протяженность контактов с соседними клетками, в процессе формирования эндотелиального монослоя в области свободной ламеллы (а) и в области контактов между клетками (б).

У одиночных клеток среднее количество микротрубочек в районе свободной ламеллы составило 6.7 ± 0.2 (на отрезок измерения 10 мкм). В группах клеток с протяженностью контактов до 50 % от периметра среднее количество микротрубочек не изменялось (рис. 8, а), статистический анализ показал, что в одиночных клетках и в клетках с относительно небольшой протяженностью контактов (1—50 %) количество микротрубочек не различается. При дальнейшем увеличении области контакта (50—100 %) среднее количество микротрубочек в районе свободной ламеллы росло, а затем не изменялось и составляло для клеток с протяженностью контактов 50—70 и 70—100 % 8.0 ± 0.5 и 8.3 ± 0.2 микротрубочек соответственно. Различие в количестве микротрубочек между клетками 4-й и 5-й групп было статистически значимым, а между клетками 5-й и 6-й групп статистически значимых различий не обнаружили.

Анализ микротрубочек в области контактов между соседними клетками показал, что наименьшее среднее количество микротрубочек характерно для клеток, не имеющих протяженных контактов (1-я и 2-я группы) (рис. 8, б). При дальнейшем формировании межклеточных контактов количество микротрубочек в этой области постепенно растет, достигая максимума в клетках сфор-

мированного монослоя. Статистически значимыми оказались различия в количестве микротрубочек между клетками, имевшими протяженность контактов 10—30 и 30—50, а также 30—50 и 50—70 %.

Таким образом, в процессе формирования эндотелиального монослоя происходит изменение количества микротрубочек на краю клетки: количество микротрубочек растет как в области свободной ламеллы, так и в районе контактов между соседними клетками. Увеличение количества микротрубочек на периферии клетки происходит неравномерно, наибольшее повышение в анализируемой области происходит при протяженности контактов 30—50 %. Когда клетка сформировала значительные по длине контакты (70 % от своего периметра и более), количество микротрубочек не изменяется.

Сравнение количества микротрубочек в районе ламеллы и в области контактов с соседними клетками показало, что среднее количество микротрубочек в области контактов всегда было выше, чем в районе свободной ламеллы. Различия между количеством микротрубочек в районе свободной ламеллы и области контакта были статистически значимыми для клеток с любой протяженностью контактов вплоть до момента образования эндотелиального монослоя *in vitro*.

Таким образом, по мере формирования эндотелиального монослоя происходят следующие изменения системы цитоплазматических микротрубочек: 1) увеличивает количество микротрубочек на краю клетки; 2) количество микротрубочек в районе контакта превышает их число для области ламеллы, не имеющей контакта, на всех этапах образования эндотелиального монослоя.

Обсуждение

Эндотелиальный монослой как функциональная модель для исследования взаимодействия цитоскелетных структур клетки. Цитоскелет клетки представляет собой комплексную систему, состоящую из трех типов филаментов, каждый из которых имеет собственные свойства и функции. Микротрубочки и актиновые филаменты играют важнейшую роль в клеточной подвижности, в то время как промежуточные филаменты выполняют в основном функцию поддержания формы клетки. Кроме того, элементы цитоскелета взаимодействуют с адгезивными структурами клетки.

Показано, что существует связь между микротрубочками и актиновыми филаментами (Rodriguez et al., 2003; Prasain, Stevens, 2009), причем эта связь осуществляется как на структурном (Watanabe et al., 2004; Prasain, Stevens, 2009; Akhmanova, Steinmetz, 2010; Applewhite et al., 2010), так и на функциональном и регуляторном уровнях (Birukova et al., 2004a, 2004b; Смурова и др., 2011; Alieva et al., 2013). Структурную роль выполняют кросс-линкерные белки, посредством которых микротрубочки и актиновые филаменты соединяются непосредственно (Fuchs, Karakesisoglou, 2001; Rodriguez et al., 2003; Bershadsky et al., 2006). В качестве регуляторных молекул выступают, в частности, ГТФазы Rho, которые могут регулировать динамику и организацию как актиновой системы, так 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).

Взаимодействие микротрубочек и промежуточных филаментов изучали не столь интенсивно. Предполагается, что микротрубочки и промежуточные филаменты взаимодействуют не прямо, а опосредованно. Белком, выполняющим роль связки между виментином и микротрубочками, может быть кинезин, а также некоторые другие белки (Dráberová, Draber, 1993; Liao, Gundersen, 1998).

Описана взаимосвязь между актиновыми филаментами и виментином. Сначала ее обнаружили на биохимическом уровне (Cary et al., 1994; Esue et al., 2006), а затем и на структурном; было установлено, что хвостовой домен виментина прямо взаимодействует с актиновыми филаментами (Esue et al., 2006).

Цитоскелет активно взаимодействует с адгезивными структурами клетки, образуя сложно скоординированную систему. Показано, что упомянутые выше ГТФазы Rho могут также регулировать динамику фокальных и межклеточных контактов (Mehta, Malik, 2006). Плюс-концевые белки микротрубочек семейства CLIP и APC вовлечены во взаимодействие с межклеточными контактами (Small, Kaverina, 2003; Lansbergen, Akhmanova, 2006; Mehta, Malik, 2006; Komarova et al., 2007). Описанные взаимодействия обеспечивают множество морфофункциональных реакций клетки и активно исследуются на культивируемых фибробластах. В эндотелиоцитах такое взаимодействие обеспечивает сжатие и расслабление клетки в процессе осуществления барьерной функции. Для эндотелиальных клеток наиболее изучено взаимодействие адгезивных комплексов с актиновым цитоскелетом (Burrige et al., 1988; Geiger et al., 2001).

Однако фибробласты, выделенные в культуру, в значительной степени отличаются от своего нативного состояния в живом организме. Адекватной моделью для исследования взаимодействия фибриллярных компонентов цитоскелета и адгезивных структур клетки является выделенный в культуру эндотелиальный монослой, в котором клетки находятся в максимально близком к живому организму физиологическом состоянии. Эта модель широко и активно используется в биохимии и иммунологии для исследования различных белковых рецепторов и молекулярных каскадов, в клеточной биологии — для исследований цитоскелетных структур и их взаимодействия с везикулярными структурами, в фармакологии и медицине — для исследования барьерной функции и дисфункции эндотелия, а также действия химических агентов на эндотелиальный монослой. Широкое использование данной культуры происходит по нескольким причинам. В первую очередь эта модель хорошо воспроизводит физиологические условия, в которых находится эндотелий *in vitro*: в организме эндотелиоциты располагаются на внутренней поверхности сосудов в виде монослоя, они растут на базальной мембране и омываются кровью со стороны апикальной поверхности. В культуральных флаконах клетки также растут в виде монослоя, культивируются на специальной белковой подложке и сохраняют базоапикальную организацию. Среда для культивирования, так же как и кровь, омывает сверху эндотелиальный монослой. Эндотелиальные клетки в течение ряда пассажей сохраняют *in vitro* свою нативную морфологию, биохимические и физиологические (барьерные) свойства, характерные для эндотелия *in vivo*. Таким образом, модель эндотелиального монослоя *in vitro* с функциональной и морфологической точек зрения наиболее приемлема для исследования нормального физиологического процесса взаимодействия цитоскелетных структур.

Основной функцией эндотелиального монослоя в живом организме является обеспечение селективного барьера между кровью и внутренним пространством всех органов. Первоначально считалось, что основным цитоскелетным компонентом, ответственным за осуществление барьерной функции и возникновение дисфункции эндотелия, является система актиновых филаментов (Dudek, Garcia, 2001). Работы последних лет показывают, что не актиновые филаменты, а микротрубочки являются той структурой, которая ответственна за начальные этапы развития барьерной дисфункции эндотелия (Смурова и др., 2008а, 2011; Alieva et al., 2013). Было показано, что деполимеризация микротрубочек нокодазолом сама по себе приводит к увеличению проницаемости монослоя эндотелиальных клеток и запускает молекулярный каскад, приводящий к барьерной дисфункции (Смурова и др., 2008б; Alieva et al., 2013), причем нарушение барьерной функции возникает при минимальном разрушении периферических микротрубочек, когда система актиновых филаментов остается интактной.

В отличие от исследования патологических состояний эндотелия исследования, связанные с поведением цитоскелетных структур в норме (например, при формировании монослоя эндотелиоцитов), начали проводить совсем недавно. Так, цитоскелетные механизмы возникновения клеточных контактов при формировании эндотелиального монослоя, связанные с функцией актиновых филаментов, исследовали в лаборатории Свиткиной (Hoelzle, Svitkina, 2012). Было установлено, что первоначальным этапом в формировании межклеточных контактов является образование обширных ламеллоподий. Затем, согласно предложенной авторами модели, происходит преобразование ее в мосты, подобные филоподиям, несущие субъединицы VE-кадгерина и дополнительные белки, организующие актин в параллельные пучки (Hoelzle and Svitkina, 2012). Таким образом, к настоящему времени взаимосвязи между отдельными элементами цитоскелета эндотелиоцитов в норме изучены недостаточно (Prasain, Stevens, 2009).

В данной работе была сделана попытка продвинуться в понимании того, какие цитоскелетные структуры и в какой степени вовлечены в процесс формирования эндотелиального монослоя. Полученные результаты позволили заключить, что по мере формирования монослоя организация промежуточных филаментов не изменяется (рис. 1, 2), актиновые филаменты утолщаются, их сеть становится более выраженной (рис. 3—5, а), а система микротрубочек реорганизуется как в зоне формирующихся контактов, так и в области свободного края (рис. 7—8).

Виментиновые филаменты при формировании эндотелиального монослоя. Виментиновые филаменты являются достаточно стабильными структурами, они связаны с фокальными контактами и стабилизируют связь эндотелиальных клеток с внеклеточным матриксом (Tsuruta, Jones, 2003). Существуют данные о том, что виментиновые филаменты непосредственно связаны с актином (Esue et al., 2006). Известно также, что сеть виментиновых филаментов в эндотелиоцитах быстро разрушается при гипоксии, при этом происходят изменения и в системе актиновых филаментов (Liu et al., 2010). Перечисленные факты указывают на возможную роль виментиновых филаментов в обеспечении барьерной функции эндотелия. Поскольку эта роль сейчас не совсем понятна (Liu et al., 2010), мы предприняли попытку оценить количественно изменения системы виментино-

вых филаментов в процессе формирования эндотелиального монослоя. Согласно полученным в настоящей работе данным, сеть виментиновых филаментов морфологически фактически не изменяется (рис. 1, 2), однако этот факт не позволяет заключить, что виментиновые филаменты не вносят своего вклада в процесс образования эндотелиального монослоя.

По данным литературы, сеть виментиновых филаментов может испытывать быстрые кратковременные изменения, например при гемодинамическом стрессе, когда происходит быстрое перемещение виментиновых филаментов, но при этом не наблюдается значительных нарушений самой сети (Helmke et al., 2001). Резкие изменения в структуре виментиновых филаментов происходят при воздействии гипоксии, причем наблюдаемая перестройка происходит совместно с изменением актиновых филаментов (Liu et al., 2010). Нельзя также исключить интегральную роль, которую могут играть виментиновые филаменты. Например, возможно, что виментиновые филаменты вовлечены в процесс позиционирования centrosомы наряду с другими промежуточными филаментами (Morgan et al., 2011). Таким образом, по-видимому, виментиновые филаменты не являются определяющим звеном в процессе образования эндотелиального монослоя, но их поведение в эндотелии требует более тщательного изучения.

Реорганизация актиновых филаментов и системы микроотрубочек при формировании эндотелиального монослоя. По мере формирования монослоя эндотелиоциты делятся и формируют межклеточные контакты с соседними клетками. В процессе образования межклеточных контактов важную роль играет система актиновых филаментов.

Проведенный количественный анализ показал, что система актиновых филаментов меняется по мере формирования межклеточных контактов: актиновых фибрилл становится больше и увеличивается их средняя толщина (рис. 3—5, *a*). Наблюдаемые изменения не происходят постепенно. Актиновых фибрилл становится больше, когда клетка сформировала межклеточные контакты более чем на трети своего края (рис. 4). Можно предположить, что это вызвано более значительным внутриклеточным натяжением, возникающим на этой стадии формирования монослоя. Актиновые пучки утолщаются позднее, когда межклеточные контакты сформировались более чем на половине клеточного края (рис. 5, *a*). По-видимому, по мере формирования эндотелиального монослоя и образования все большего числа контактов между соседними клетками увеличивается число внутриклеточных осей напряжения, вдоль которых формируются выраженные актиновые пучки. Возможно также, что эти изменения связаны (и протекают параллельно) с формированием новых фокальных контактов, с которыми актиновые филаменты непосредственно связаны.

Несмотря на важную роль актиновых филаментов, в настоящее время все большее количество данных свидетельствует о том, что система микроотрубочек является ключевым звеном во взаимодействии с адгезивными структурами и обеспечении барьерной функции. Известно, что динамическая нестабильность концов микроотрубочек, их способность к частой смене фаз сборки и разборки позволяют микроотрубкам локально модулировать динамику фокальных клеточных контактов (в движущихся фибробластах путем прямого направленного взаимодействия плюс-концов микроотрубочек с фокаль-

ми контактами — так называемого таргетинга контактов (Kaverina et al., 1999; Efimov et al., 2007)), а также регулировать динамику межклеточных контактов (Shewan et al., 2005; Stehbens et al., 2006). Все это позволяет предположить, что микроотрубочки могут играть значительную роль в формировании эндотелиального монослоя.

Описанные в настоящей работе изменения, происходящие в системе микроотрубочек при формировании монослоя эндотелиоцитов, оказались наиболее выраженными среди всех цитоскелетных систем (рис. 7, 8), и эти изменения наиболее заметны на периферии клетки. Отмечался рост общего числа микроотрубочек в районе краевых областей клетки по мере формирования эндотелиального монослоя. Число микроотрубочек на всех стадиях формирования эндотелиального монослоя было выше в районе контакта с соседней клеткой, чем в области свободной ламеллы. Такое различие можно объяснить, с одной стороны, вовлечением centrosомы как основного центра полимеризации микроотрубочек в эндотелиоцитах в процесс формирования эндотелиального монослоя и локальным повышением ее активности. С другой стороны, такую разницу можно объяснить закориванием митос-концов свободных микроотрубочек в зоне межклеточных контактов, описанным ранее и характерным для эпителиальных клеток (Meng et al., 2008), либо возможной стабилизацией плюс-концов микроотрубочек в зоне VE-кадгеринных контактов (Gundersen et al., 2004). Возможно также, что сами динамические микроотрубочки регулируют локальную концентрацию VE-кадгерина в межклеточных контактах подобно тому, как описано в эпителиальных клетках (Stehbens et al., 2006).

Таким образом, двигателем процесса формирования монослоя являются, по-видимому, микроотрубочки. Система микроотрубочек испытывает наиболее выраженные изменения, и эти изменения происходят на краю клетки. Поскольку большинство микроотрубочек в эндотелиоците связано с centrosомой, можно предположить, что centrosома вовлечена в процесс формирования эндотелиального монослоя. Проверке этого предположения будет посвящена наша следующая работа.

Авторы выражают благодарность Р. Э. Узбекову за плодотворное обсуждение рукописи статьи, замечания и рекомендации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 09-04-00363 и № 12-04-00488) и Национального института здоровья США (NIH) (проекты HL067307, HL080675 и HL101902).

Список литературы

- Смулова К. М., Бирюкова А. А., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2008а. Система микроотрубочек при барьерной дисфункции эндотелия: деполимеризация на краю клетки и реорганизация во внутренней цитоплазме. Цитология. 50 (1): 49—55. (Smurova K. M., Birukova A. A., Verin A. D., Alieva I. B. 2008. Microtubule system in endothelial barrier dysfunction: disassembly of peripheral microtubules and microtubule reorganization in internal cytoplasm. Cell Tissue Biol., 2: 45—52.)
- Смулова К. М., Бирюкова А. А., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2008б. Дозозависимый эффект нокодазола на цитоскелет эндотелиальных клеток. Биол. мембраны. 25 (3): 181—190. (Smurova K. M., Birukova A. A., Verin A. D., Alieva I. B. 2008. Dose-de-

- pendent effect of nocodazole on endothelial cell cytoskeleton. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biol.*, 2 (2) : 119—127.)
- Смурова К. М., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2011. Эффект ингибирования Rho-киназы при барьерной дисфункции зависит от природы факторов, изменяющих проницаемость эндотелия. *Цитология*. 53 (4) : 359—366. (Smurova K. M., Verin A. D., Alieva I. B. 2011. Inhibition of RHO-kinase depends on factors that modify endothelial permeability. *Cell Tissue Biol.*, 5 : 221—227.)
- Akhmanova A., Steinmetz M. O. 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123 : 3415—3419.
- Alieva I. B., Verin A. D. 2013. The functional role of the microtubule/microfilament cytoskeleton in the regulation of pulmonary vascular endothelial barrier. In: *Endothelial cytoskeleton*. New York: Science Publishers. 116—145.
- Alieva I. B., Zemskov E. A., Smurova K. M., Kaverina I. N., Verin A. D. 2013. The leading role of microtubules in endothelial barrier dysfunction: disassembly of peripheral microtubules leaves behind the cytoskeletal reorganization. *J. Cell. Biochem.* In press.
- Applewhite D. A., Grode K. D., Keller D., Zadeh A. D., Slep K. C., Rogers S. L. 2010. The spectraplakins short stop is an actin — microtubule cross-linker that contributes to organization of the microtubule network. *Mol. Biol. Cell.* 21 : 1714—1724.
- Bershadsky A. D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A. Y., Verkhovskiy A. B., Shemesh T., Kozlov M. M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur. J. Cell Biol.* 85 : 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.
- Bogatcheva N. V., Garcia J. G., Verin A. D. 2002. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochem. (Moscow)*. 67 : 75—84.
- Bruneel A., Labas V., Mailloux A., Sharma S., Vinh J., Vaubourdel M., Baudin B. 2003. Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteom.* 3 : 714—723.
- Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4 : 487—525.
- Cary R. B., Klymkowsky M. W., Evans R. M., Domingo A., Dent J. A., Backhus L. E. 1994. Vimentin's tail interacts with actin-containing structures *in vivo*. *J. Cell Sci.* 107 : 1609—1622.
- Cattan C. E., Oberg K. C. 1999. Vinorelbine tartrate-induced pulmonary edema confirmed on rechallenge. *Pharmacoth.* 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.
- 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.
- Dráberová E., Dráber P. 1993. A microtubule-interacting protein involved in coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules. *J. Cell Sci.* 106 : 1263—1273.
- Dudek S. M., Garcia J. G. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol.* 91 : 1487—1500.
- Efimov A., Kharitonov A., Efimova N., Loncarek J., Miller P. M., Andreyeva N., Gleeson P., Galjart N., Maia A. R. R., McLeod I. X., Yates J. R., III, Maiato H., Khodjakov A., Akhmanova A., Kaverina I. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Devel. Cell.* 12 : 917—930.
- Esue O., Carson A. A., Tseng Y., Wirtz D. 2006. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J. Biol. Chem.* 281 : 30 393—30 399.
- 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.
- Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K. M. 2001. Transmembrane extracellular matrix — cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 2 : 793—805.
- Groeneveld A. B. 2002. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vasc. Pharm.* 39 : 247—256.
- Gundersen G. G., Gomes E. R., Wen Y. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr. Opin. in cell biol.* 16 : 106—112.
- Helmke B. P., Thakker D. B., Goldman R. D., Davies P. F. 2001. Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells. *Biophys. J.* 80 : 184—194.
- Hoelzle M. K., Svitkina T. 2012. The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. *Mol. Biol. of the Cell.* 23 : 310—323.
- 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.
- Jalimarada S. S., Shivanna M., Kini V., Mehta D., Srinivas S. P. 2009. Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp. eye res.* 89 : 333—343.
- Jordan M. A., Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* 4 : 253—265.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J. V. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation. *J. Cell. Biol.* 146 : 1033—1043.
- Komarova Y. A., Mehta D., Malik A. B. 2007. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci. STKE.* 2007 : re8.
- Lansbergen G., Akhmanova A. 2006. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 7 : 499—507.
- Liao G., Gundersen G. G. 1998. Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J. Biol. Chem.* 273 : 9797—9803.
- Liu T., Guevara O. E., Warburton R. R., Hill N. S., Gaestel M., and Kayyali U. S. 2010. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 299 : C363—C373.
- Lum H., Malik A. B. 1996. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74 : 787—800.
- Mehta D., Malik A. B. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 86 : 279—367.
- Meng W., Mushika Y., Ichii T., Takeichi M. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135 : 948—959.
- Morgan J. T., Pfeiffer E. R., Thirkill T. L., Kumar P., Peng G., Fridolfsson H. N., Douglas G. C., Starr D. A., Barakat A. I. 2011. Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. *Mol. Biol. Cell.* 22 : 4324—4334.
- 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.
- Pasquier E., Honore S., Pourroy B., Jordan M. A., Lehmann M., Briand C., Braguer D. 2005. Antiangiogenic concentrati-

ons of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells. *Cancer Res.* 65 : 2433—2440.

Prasain N., Stevens T. 2009. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* 77 : 53—63.

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.

Schwartz E. L. 2009. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin. Cancer Res.* 15 : 2594—2601.

Shewan A. M., Maddugoda M., Kraemer A., Stehbens S. J., Verma S., Kovacs E. M., Yap A. S. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-Cadherin at cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 4531—4542.

Shivanna M., Srinivas S. P. 2009. Microtubule stabilization opposes the (TNF- α)-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 89 : 950—959.

Small J. V., Kaverina I. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 40—47.

Stebbens S. J., Paterson A. D., Crampton M. S., Shewan A. M., Ferguson C., Akhmanova A., Parton R. G., Yap A. S. 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J. Cell Sci.* 1199 : 1801—1811.

Tsuruta D., Jones J. C. 2003. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J. Cell Sci.* 116 : 4977—4984.

Uoshima N., Yoshioka K., Tegoshi H., Wada S., Fujiwara Y., Satake N., Kasamatsu Y., Yokoho S. 2001. Acute respiratory failure caused by vinorelbine tartrate in a patient with non-small cell lung cancer. *Intern. Med.* 40 : 779—782.

Van Nieuw Amerongen G. P., Vermeer M. A., van Hinsbergh V. W. 2000. Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 : e127—e133.

Watanabe T., Wang S., Noritake J., Sato K., Fukata M., Takefuji M., Nakagawa M., Izumi N., Akiyama T., Kaibuchi K. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Develop. Cell.* 7 : 871—883.

Поступила 26 VII 2013

ENDOTHELIAL CELL CYTOSKELETON REORGANIZATION DURING FUNCTIONAL MONOLAYER FORMATION *IN VITRO*

A. S. Shakhov,¹ A. D. Verin,² I. B. Alieva^{1, 2, *}

¹ Electron Microscopy Department, A. N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia, and ² Vascular Biology Center, Georgia Regents University, Augusta, GA 30912, USA;

* e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru

The endothelium lining the inner surface of blood vessels regulates vascular permeability, permitting the exchange between the blood circulating in vessels and tissue fluid, and performs thereby the barrier function. Endothelial cells cultured *in vitro* retain the ability to perform a barrier function that is inherent in vascular endothelial cells *in vivo*. Endothelial monolayer *in vitro* is a unique model system that allows studying the interaction of cytoskeletal and adhesive structures of endothelial cells from the earliest stages of its formation. In this paper we describe and characterize quantitatively the changes in the cytoskeleton of endothelial cells from the time of endothelial cells spreading on the glass and formation of the first contacts between neighboring cells until the formation of a functional confluent monolayer. The main type of intermediate filaments of endothelial cells were vimentin filaments. The location of vimentin filaments and their number did not change at different stages of the endothelial monolayer formation, they occupied more than 80 % of the cells. The system of actin filaments in endothelial cells was represented by the cortical actin at the cell periphery and bundles of actin stress fibers arranged in parallel. Upon the formation of contacts with neighboring cells the number and thickness of actin filaments increased. In addition, the formation of the endothelial monolayer led to changes in microtubule network, which was evident from the increase in the number of microtubules at the cell edge. Further, at all stages of assembling the endothelial monolayer, the number of microtubules formed at the cell margin in the area of cell-cell contacts exceeded the number of microtubules in the area of the free lamellae.

Key words: pulmonary endothelium, endothelial monolayer formation, endothelial cell cytoskeleton, intermediate filaments, actin filaments, microtubules.