

УЧАСТИЕ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В МИГРАЦИИ СОСУДИСТЫХ КЛЕТОК И В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И ВЕТВЛЕНИЯ КАПИЛЛЯРОВ

© *Е. В. Семина, К. А. Рубина,¹ В. Ю. Сысоева, П. И. Макаревич, Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук*

Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119192;

¹ электронный адрес: rkseniya@mail.ru

Урокиназная система, представляющая собой активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа, uPA), урокиназный рецептор (uPAR) и ингибиторы активаторов плазминогена (PAI-1 и PAI-2), играет важную регуляторную роль в сосудистой стенке и обладает способностью не только запускать протеолитический каскад и деградацию внеклеточного матрикса, но и активировать внутриклеточную сигнализацию в клетках сосудов. В данной работе впервые показан фундаментальный механизм регуляции траектории роста и ветвления кровеносных сосудов с участием урокиназной системы, который может иметь особое значение в процессах роста сосудов в раннем эмбриогенезе, а также во взрослом организме при репарации (регенерации) тканей.

Ключевые слова: урокиназа, урокиназный рецептор, ангиогенез, навигационные рецепторы, ветвление сосудов.

Принятые сокращения: uPA — активатор плазминогена урокиназного типа, или урокиназа, uPAR — рецептор урокиназы, ГМК — гладкомышечные клетки, БСА — бычий сывороточный альбумин, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Урокиназная система представляет собой группу белков, участвующих в процессах активации плазминогена и фибринолиза (Collen, 1999; Степанова и др., 2008). В число этих белков входит урокиназа uPA — сериновая протеаза, которая активирует плазминоген, переводя его в активное состояние плазмин и рецептор урокиназы (Ткачук et al., 1996; Collen, 1999). В структуре урокиназы выделяют три домена — N-концевой домен, подобный эпидермальному фактору роста (ростовой домен), крингл-домен и C-концевой протеолитический домен. Ростовый домен обеспечивает высокоаффинное связывание uPA со своим рецептором (uPAR). Крингл-домен принимает участие в стабилизации комплекса урокиназы с uPAR и его взаимодействия с компонентами внеклеточного матрикса. Рецептор урокиназы uPAR представляет собой трехдоменный белок, заякоренный на мембране через гликозилфосфатидилинозитол, что обеспечивает его высокую подвижность на поверхности мембраны; он имеет важное значение для регуляции направленного движения клеток. Так, высокая подвижность урокиназного рецептора обеспечивает возможность концентрации комплекса uPA/uPAR на лидирующем крае клетки — там, где необходима высокая протеолитическая активность (Blasi, Carmeliet, 2002; Gardsvoll et al., 2006).

К урокиназной системе также относят белки-ингибиторы урокиназы PAI-1 и PAI-2, а также ряд компонентов, участвующих в сопряжении урокиназы и ее рецептора с другими структурами в клетке (интегринами, витронектином, gp-120, LRP/α2-MR, рецепторами хемокинов

и др.) (Goretzki, Mueller, 1998; Behrendt, 2004; Franco et al., 2006). Помимо активации плазминогена урокиназа обладает способностью активировать ряд сигнальных процессов в клетке, приводящих к миграции и пролиферации клеток (Tang et al., 1998; Парфенова и др., 2009; Carriero et al., 2011). В ряде исследований было показано влияние урокиназы и ее рецептора на стимуляцию дифференцировки и пролиферации гладкомышечных и эндотелиальных клеток в процессе ремоделирования сосудов (Falkenberg et al., 2002; Menshikov et al., 2006; Plekhanova et al., 2006).

Результаты наших ранних исследований с использованием экспериментальной модели рестеноза показывают, что активность урокиназной системы в мигрирующих и пролиферирующих клетках сосудов, так же как и экзогенное введение рекомбинантной урокиназы в стенку поврежденного сосуда, стимулируют развитие неоинтимы и неоадвентиции, миграцию, пролиферацию и фенотипическую трансформацию клеток сосудов (Resnati et al., 1996; Tang et al., 1998; Парфенова и др., 2009). Обнаружено также, что урокиназная система стимулирует ангиогенез (Neumans et al., 1999; Colombo et al., 2007). Это объясняется ее активирующим влиянием на миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов за счет концентрации uPA/uPAR на лидирующем крае сосудистых клеток и локального протеолиза компонентов внеклеточного матрикса (Blasi, Carmeliet, 2002; Gardsvoll, 2006).

Процесс активного роста и ремоделирования сосудов тесно сопряжен с активацией ангиогенных факторов, де-

понированных во внеклеточном матриксе, таких как VEGF, HGF, bFGF, ангиопоэтин, и других факторов роста, а также хемоаттрактантов и завершается формированием функционально зрелых кровеносных сосудов (Carmeliet, 2000; Rubina et al., 2009). Однако траектория роста и характер ветвления кровеносных сосудов не могут быть объяснены только градиентом факторов роста и хемоаттрактантов, так как при росте сосудов окружающие клетки продуцируют факторы, вызывающие положительный и отрицательный хемотаксис.

Известно, что в процессах, определяющих направление роста сосудов, участвуют так называемые навигационные рецепторы: взаимодействие навигационных рецепторов с лигандами на клетках растущих сосудов и (или) клетках тканей, через которые они прорастают, приводит к формированию сложной разветвленной сосудистой сети (Carmeliet, 2003; Melani, Weinstein, 2010). Несмотря на то что доказана роль навигационных рецепторов в регуляции выбора траектории движения клеток и роста кровеносных сосудов, неизвестны механизмы их участия в регуляции ветвления сосудов. В настоящее время урокиназную систему относят к навигационным молекулам, участвующим в процессах регуляции ангиогенеза, однако ее роль в выборе траектории роста сосудов и ветвления до конца неясна.

В настоящей работе мы исследовали возможное участие компонентов урокиназной системы в этих процессах. Оказалось, что урокиназная система не только влияет на миграцию сосудистых клеток и формирование капиллярноподобных трубочек, но и определяет процессы ветвления сосудистых структур и фенотип гладкомышечных клеток. Это первое сообщение об участии урокиназы и урокиназного рецептора в процессах ветвления кровеносных сосудов.

Материал и методика

Работа с лабораторными животными. При проведении экспериментов соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984 и нормы, утвержденные Комиссией по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова. Использовали мышей в возрасте 4–8 нед, лишенных гена урокиназы (мышей PLAU), которые были получены от мышей C57/B6 в лаборатории д-ра Carmeliet (Herbert et al., 1997) и мышей дикого типа C57.

Формирование капиллярноподобных структур на трехмерной эксплантной модели колечка аорты мыши в Матригеле. Для оценки влияния урокиназной системы на рост и ветвление сосудов была использована описанная ранее модель (Nicosia, Ottinetti, 1990) с модификациями (Rubina et al., 2007). Для выделения аорты мышью летально анестезировали ингаляционным наркозом изофлурана (IsoFlo®, USP) и далее обескровливали путем декапитации. Брюшную аорту очищали от окружающих тканей, перевязывали нитками дистально в районе аортальной арки и проксимально в районе бифуркации и перерезали ножницами (рис. 1). Выделенную аорту помещали в чашку Петри со стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS). Чашки переносили в культуральный блок и дальнейшие манипуляции осуществляли в стерильных условиях. Кусочки

аорты нарезали на колечки длиной 3 мм и помещали в лунки 8-луночных культуральных планшетов с тонким стеклянным дном (Lab-Tek™ Chambered Coverglass, Thermo Scientific, номер по каталогу 155411, США). К кусочкам аорты добавляли 60–80 мкл холодного (4 °С) Матригеля (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, Германия). В ряде экспериментов в Матригель вносили блокирующие uPAR антитела (R&D Systems, номер по каталогу MAB531, Англия) или неиммунные IgG в эквивалентной концентрации в качестве контроля. Образцы помещали в инкубатор (37 °С, 5 % CO₂) на 10 мин для полимеризации Матригеля. Затем в лунки вносили среду культивирования для эндотелиальных клеток EGM-2 (Lonza, США). Среду меняли на свежую каждые 5 сут. Визуализацию мигрирующих клеток осуществляли с использованием темнопольной микроскопии при малых увеличениях (об. 5× или 10×).

Иммунофлуоресцентное окрашивание эксплантов аорты. Для предотвращения деполимеризации Матригеля все процедуры проводили при 37 °С. Для иммунофлуоресцентного окрашивания образцы в лунках промывали теплым PBS (Sigmaaldrich, США) и фиксировали 4%-ным формальдегидом в течение 24 ч (Panreac, Испания). Для пермеабилзации Матригеля в лунки вносили 1 % Тритона X-100 (Triton® X-100, Peroxide Free, Panreac, Испания) на 24 ч, который затем отмывали в течение 24 ч в PBS. Для блокирования неспецифического окрашивания образцы в течение 24 ч обрабатывали 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigmaaldrich, США) на PBS, содержащим 1 % Тритона X-100. Далее в лунки вносили раствор первых антител против гладкомышечного актина мыши (α -SMA, Sigma-Aldrich) или против антигена эндотелиальных клеток CD31 мыши (BD). Инкубацию в растворе первых антител проводили в течение 24 ч, отмывали в PBS в течение 24 ч и помещали в раствор вторых антител, конъюгированных с флуорохромом AlexaFluor-594 (Molecular Probes, США). Через 24 ч образцы отмывали от вторых антител, ядра докрашивали DAPI. После промывки в PBS в образцы добавляли PBS, содержащий 0.001 % азида натрия (NaN₃). Изображения получали с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на микроскопе Leica (TCS SP5, Германия), оснащенного объективом Plan-Apo с увеличением 104. Флуоресцентные красители DAPI и AlexaFluor® 594 последовательно визуализировали с помощью лазера с длинами волн 405 и 594 нм соответственно. Все иммунофлуоресцентные изображения были получены при одинаковых настройках микроскопа. На каждом рисунке представлен воспроизводимый результат трех независимых экспериментов. Для анализа изображений использовали программу MetaMorph 5.0 (Universal Imaging, США).

Электрофорез белков и Вестерн-блоттинг. Образцы аорты помещали в холодный PBS и инкубировали на льду в течение 30 мин, затем образцы заливали азотом и растирали пестиком в фарфоровой ступке до полной гомогенизации. Гомогенаты переносили в эппендорфы, взвешивали, заливали эквивалентным количеством лизирующего буфера (100 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 % Тритона X-100, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, ингибиторы протеиназ (Pierce) 1 : 100, PMSF 1 : 100) и инкубировали в нем в течение 15 мин. Концентрацию белка в лизате определяли методом Бредфорд. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия с испо-

льзованием буфера Лаеммли в 10%-ном полиакриламидном геле. После переноса белков из геля на PVDF-мембрану (Millipore, Германия) для блокирования неспецифического связывания мембрану преинкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока на PBS, содержащем 0.05 % Tween 20 (Pierce, США). Мембрану последовательно инкубировали с первыми (против uPAR мыши или актина мыши) и вторыми антителами (конъюгированными пероксидазой) при комнатной температуре в течение 60 мин. Визуализацию проводили с помощью 2-компонентной ECL-системы (Pierce) с последующей экспозицией на рентгеновской пленке BioMax (Kodak, США). Представлен воспроизводимый результат из трех независимых экспериментов.

Получение кондиционированной среды, содержащей мышиную урокиназу. Для получения кондиционированной среды, содержащей функционально активную урокиназу мыши, были использованы линейные клетки HEK293. Клетки трансфицировали плазмидой для экспрессии урокиназы мыши (pcNDA3.1/uPA) с использованием реагента Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, США) в бессывороточной среде Opti-MEM (Gibco, Англия). Среду собирали и центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант переносили в чистые пробирки и концентрировали в 10 раз с использованием фильтров Centricon (YM-50, Millipore, Германия), задерживающих белки с мол. массой менее 50 кДа. Содержание урокиназы определяли методом ELISA с использованием набора Mouse PLAU/Urokinase/UPA ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, США) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. На графиках представлены средние значения и их стандартная ошибка. Различия считали достоверными при уровне значимости меньше $P < 0.05$.

Результаты

Для оценки влияния урокиназной системы на рост и ветвление сосудов мы использовали *ex vivo* трехмерную (3D) модель эксплантной культуры брюшной аорты мыши в Матригеле (RAE, ring aorta explant) (рис. 1). Эта система является уникальной моделью ангиогенеза, так как позволяет прижизненно оценивать влияние различных веществ, введенных в Матригель, на скорость миграции сосудистых клеток и динамику роста капилляроподобных структур. С помощью этого метода мы оценивали направление и скорость миграции сосудистых клеток (гладкомышечных и эндотелиальных), траекторию роста и характер ветвления капилляроподобных структур, отрастающих из эксплантов аорты в Матригель. Характер миграции клеток и роста капилляроподобных структур оценивали в динамике на протяжении 14 сут с помощью световой микроскопии. В работе использовали экспланты аорты мышей дикого типа (uPA+/+) и мышей, нокаутированных по гену урокиназы PLAU (uPA-/-). Помимо этого, в работе использовали антитела против uPAR (anti-uPAR), препятствующие его специфическому связыванию с урокиназой. Трехмерные экспланты аорты окрашивали антителами к CD31, маркеру эндотелиальных клеток, для визуализации мигрирующих эндотелиальных клеток и сформированных ими капилляроподобных структур, а также антителами к

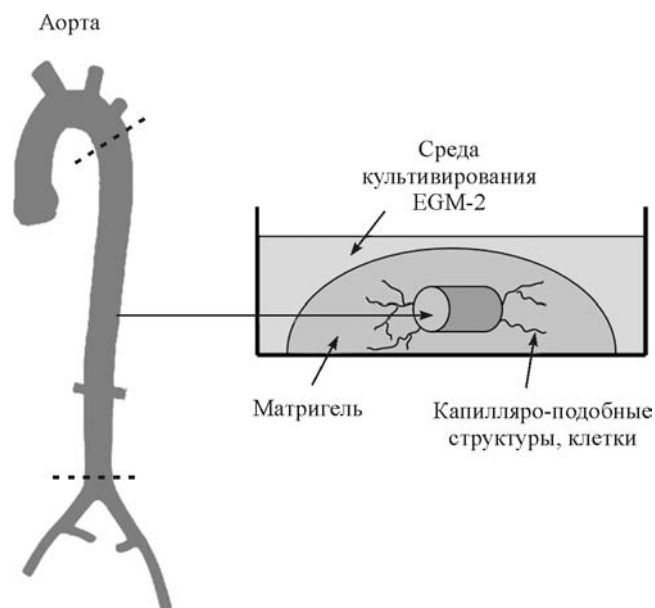


Рис. 1 Трехмерная модель экспланта брюшной аорты мыши в Матригеле.

Среда культивирования — EGM-2. Прерывистой линией слева показаны зоны резекции брюшной аорты.

α -SMA для визуализации гладкомышечных клеток (ГМК).

Изучая динамику миграции сосудистых клеток из эксплантов аорты в Матригель, обнаружили, что у PLAU-мышей количество промигрировавших клеток, а также скорость их миграции существенно снижены по сравнению с контролем. На рис. 2, а представлено изображение эксплантов аорты через 14 сут после начала эксперимента, стрелками показано направление миграции клеток из эксплантов. Видно, что у мышей с «выключенным» геном урокиназы (uPA-/-) существенно снижена длина миграционного пути клеток из экспланта по сравнению с контролем (uPA+/+). Статистически значимые результаты обобщены представлены на рис. 2, б и в. Таким образом, миграция сосудистых клеток из эксплантов зависит от экспрессии урокиназы: «выключение» гена урокиназы существенно снижает как спонтанную миграцию клеток (общее число клеток вокруг экспланта), так и скорость их миграции (длина миграционного пути).

Анализируя экспрессию uPAR методом Вестерн-блоттинга, мы обнаружили, что нокаутирование гена урокиназы приводит к снижению экспрессии урокиназного рецептора. На рис. 3 представлен результат оценки экспрессии uPAR на уровне белка в образцах аорты, полученных от трех мышей. Мы предположили, что снижение миграционной активности сосудистых клеток, полученных от мышей uPA-/-, может быть обусловлено не только отсутствием урокиназы, но и снижением экспрессии uPAR.

Визуализация в световой микроскоп мигрирующих из эксплантов в Матригель клеток не дает полного представления о том, какие именно сосудистые клетки выходят из аорты. Для того чтобы определить, на какой тип сосудистых клеток урокиназная система оказывает большее влияние, было проведено иммунофлуоресцентное мечение эксплантов аорты на 14-е сут их культивирования в Матригеле антителами против CD31 (к эндотелиальным клеткам) и антителами против α -SMA ГМК. На рис. 4 представлено иммунофлуоресцентное мечение экс-

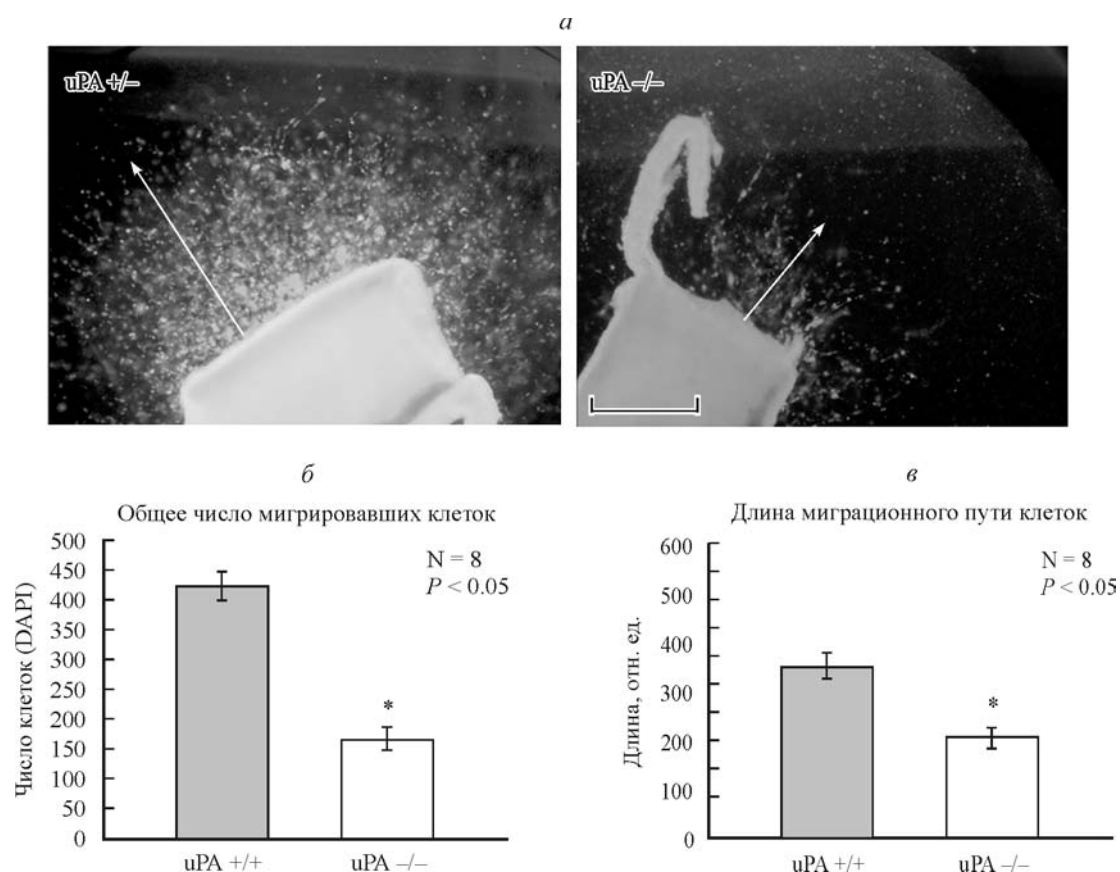


Рис. 2 Влияние урокиназы на миграцию клеток из эксплантов аорты мыши.

а — трехмерная культура брюшной аорты в Матригеле. Через 14 сут культивирования эксплантов *ex vivo* количество сосудистых клеток, промигрировавших в Матригель, в случае PLAУ-мышей (экспланты *uPA*^{-/-}) было значительно ниже, чем в контроле (*uPA*^{+/+}). Длина миграционного пути соответствует длине стрелки. Масштабный отрезок — 250 мкм. б — количественная оценка промигрировавших клеток, в — длина миграционного пути клеток. Представлены данные статистического обчета восьми эксплантов, различия достоверны ($P < 0.05$).

плантов аорты с последующей трехмерной визуализацией с помощью антител к CD31 (а), антител к α -SMA (б) и конфокального микроскопа.

Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания позволили предположить, что у мышей, нокаутированных по *uPA*, существенно снижается количество промигрировавших ГМК, в то время как миграция эндотелиальных клеток остается на прежнем уровне. Для проверки этого предположения мы провели статистический обсчет полученных изображений. При этом количество промигрировавших клеток оценивали по числу ядер, окрашенных DAPI, в Матригеле вокруг эксплантов. Данные количественной оценки подтвердили предположение о том, что отсутствие урокиназы тормозит миграцию ГМК из эксплантов в Матригель (рис. 5, б), но не влияет на миг-

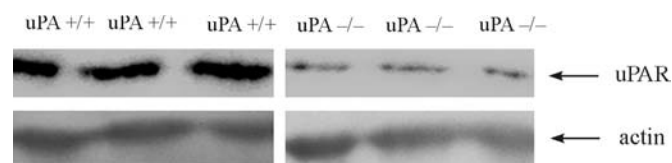


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ экспрессии урокиназного рецептора (uPAR) в трех аортах мышей.

uPA^{+/+} — экспрессия uPAR в аорте контрольных мышей, *uPA*^{-/-} — экспрессия uPAR в аорте мышей, лишенных гена урокиназы. Данные нормированы по содержанию актина (actin). Представлен воспроизводимый результат трех независимых экспериментов.

рацию эндотелиальных клеток (рис. 5, а). Статистически достоверная разница ($P < 0.05$) наблюдалась в случае ГМК, мигрировавших из эксплантов, полученных от PLAУ-мышей, по сравнению с контрольными. Таким образом, урокиназа важна для миграции ГМК, поскольку именно количество выползающих ГМК значительно ниже в случае эксплантов аорты, полученных от PLAУ-мышей, по сравнению с контролем. Количество мигрирующих эндотелиальных клеток в эксплантах, полученных от контрольных и PLAУ-мышей, достоверно не различалось.

Для выявления роли урокиназного рецептора в процессах направленной миграции клеток, формирования и ветвления капилляроподобных структур, а также влияния uPAR на фенотип сосудистых клеток мы использовали антитела, блокирующие урокиназный рецептор. Для этого блокирующие антитела добавляли в Матригель при высаживании эксплантов аорты, полученных от контрольных мышей (*uPA*^{+/+}) и мышей, лишенных гена урокиназы (*uPA*^{-/-}). Через 14 сут культуру эксплантов аорты красили иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к CD31 и α -SMA и визуализировали с помощью конфокальной микроскопии. На рис. 6 показан результат окрашивания эндотелиальных клеток, мигрировавших в Матригель из эксплантов, полученных от контрольных мышей, на фоне блокирования uPAR. На рис. 7 показан результат окрашивания ГМК клеток, мигрировавших в Матригель из эксплантов, полученных от

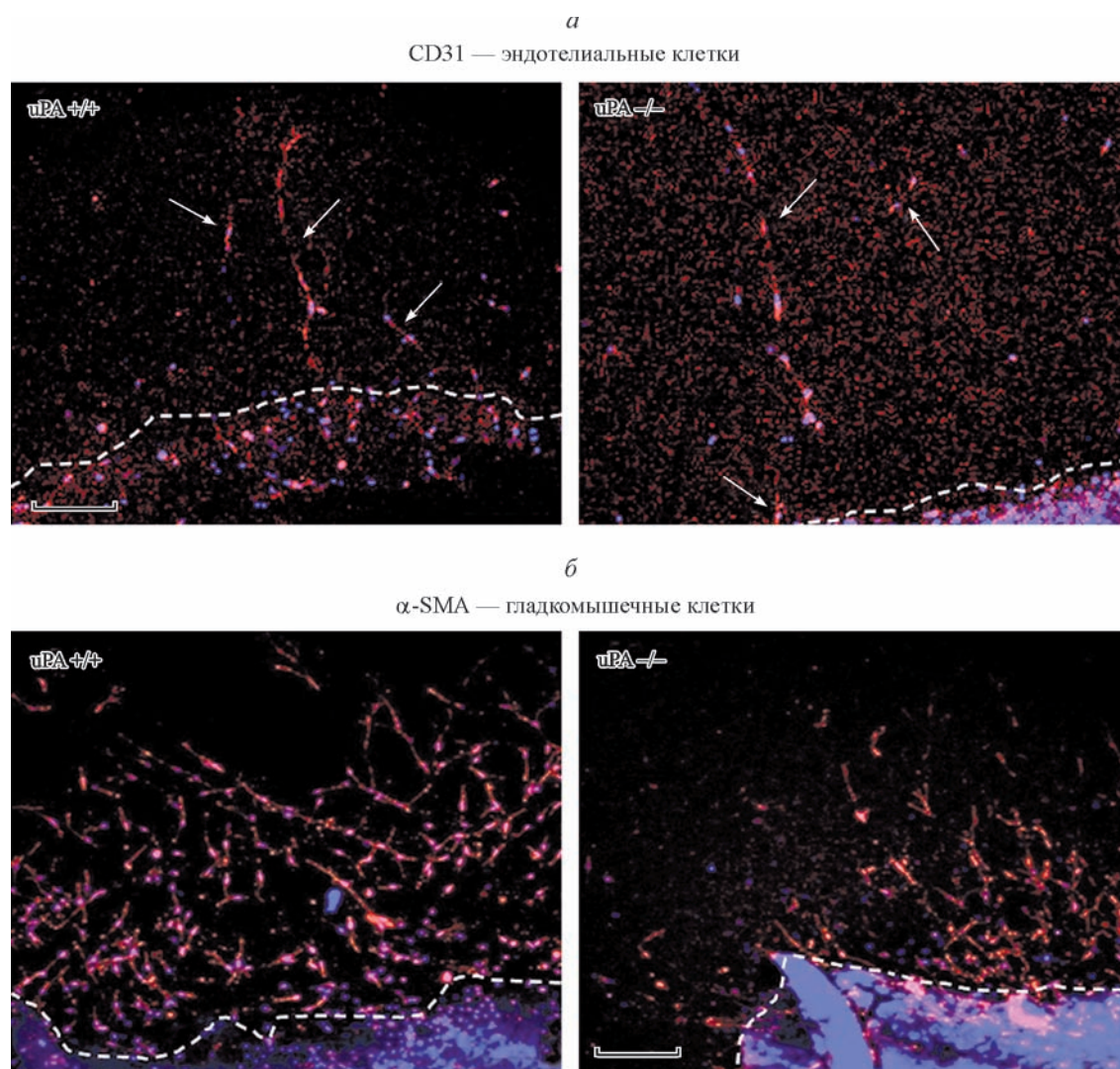


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание трехмерной культуры клеток, мигрирующих из эксплантов брюшной аорты мыши в Матригель.

Образцы аорты контрольных мышей (uPA^{+/+}) и мышей, лишенных гена урокиназы (uPA^{-/-}), окрашены антителами к CD31 (а, красная флуоресценция) и антителами к α-SMA (б, красная флуоресценция). Ядра докрасены DAPI (синяя флуоресценция). Стрелками (а) показаны CD31-положительные капилляроподобные структуры, штриховой линией отмечена зона тканевого экспланта. Трехмерную визуализацию флуоресцентного окрашивания осуществляли с использованием конфокального микроскопа. Представлен воспроизводимый результат трех независимых экспериментов. Масштабный отрезок — 250 мкм.

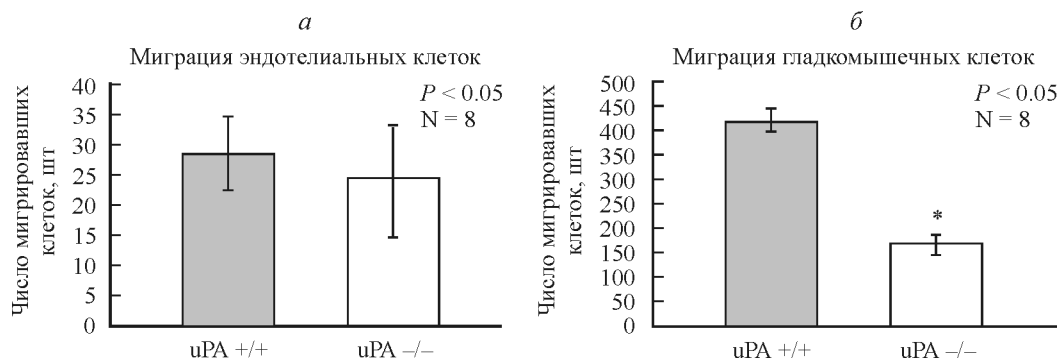


Рис. 5. Влияние урокиназы (uPA) на миграцию эндотелиальных клеток (а) и гладкомышечных клеток (б).

Отсутствие uPA не влияет на миграцию эндотелиальных клеток (а), «выключение» гена урокиназы приводит к подавлению миграции гладкомышечных клеток (б). Миграцию в Матригель оценивали на окрашенных соответствующим маркером образцах. Представлен статистически значимый результат (б) обседа восьми эксплантов, Масштабный отрезок — 250 мкм. $P < 0.05$.

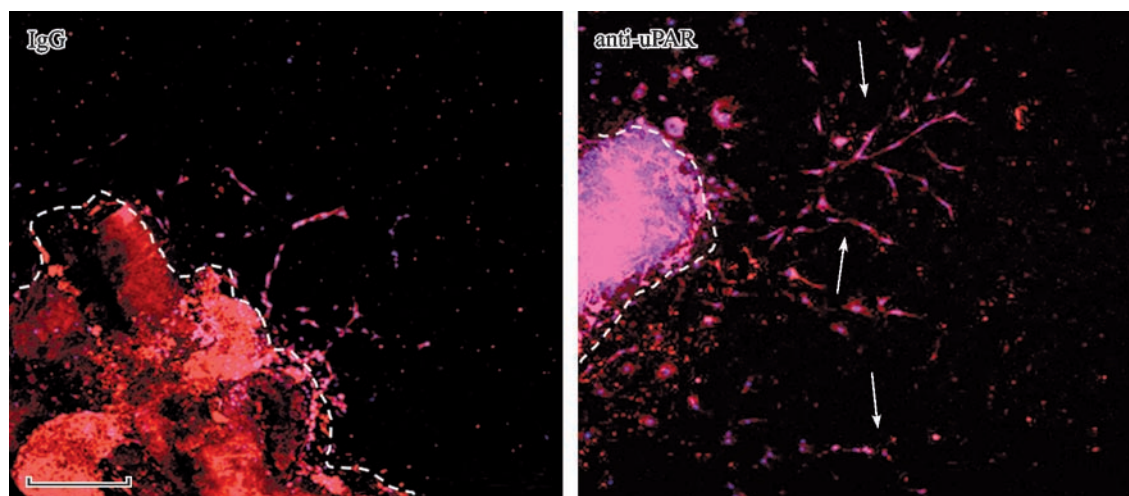


Рис. 6. Блокирование uPAR (anti-uPAR') вызывает усиление ветвления капилляроподобных структур.

Образцы эксплантов аорты зафиксированы и окрашены антителами, выявляющими эндотелиальные клетки (CD31 — красная флуоресценция). Ядра докрашены DAPI (синяя флуоресценция). Стрелками указаны точки ветвления CD31-позитивных структур на фоне блока урокиназного рецептора. Конфокальная микроскопия. IgG — неиммунные антитела anti-uPAR — антитела, блокирующие uPAR. Штриховой линией показана зона тканевого экспланта. Представлен воспроизводимый результат трех независимых экспериментов. Масштабный отрезок — 250 мкм.

обоих типов мышей (в контроле uPA^{+/+}, при выключении гена урокиназы uPA^{-/-}) при блокировании uPAR.

Использование антител, блокирующих функциональную активность uPAR, приводит к увеличению ветвления капилляроподобных структур (рис. 6) и изменению морфологии гладкомышечных клеток (рис. 7, а, б). В контрольных эксплантах мигрирующие ГМК характеризуются веретенообразной формой, что свидетельствует об их промигранторном фенотипе (рис. 7, а). При блокировании uPAR ГМК приобретают распластанную форму, и это позволяет предполагать что клетки теряют поляризацию и фенотип, характерный для направленной клеточной миграции (рис. 7, б). В эксплантах мышей, лишенных гена урокиназы, блокирование uPAR также вызывает изменение морфологии ГМК, однако если в контрольных эксплантах uPA^{+/+} некоторые ГМК сохраняют веретенообразную форму (рис. 7, а, anti-uPAR), то в эксплантах мышей, нокаутированных по гену урокиназы uPA^{-/-}, такие клетки практически исчезают (рис. 7, б, anti-uPAR).

Для подтверждения полученных данных о роли uPA/uPAR-системы в регуляции клеточной миграции урокиназу и (или) блокирующие uPAR-антитела экзогенно добавляли в систему культивирования эксплантов аорты. uPA добавляли в Матригель и в среду культивирования эксплантов в конечной концентрации 50 нг/мл; антитела, блокирующие uPAR, вносили в Матригель в концентрации 25 мкг/мл; БСА и неиммунные антитела IgG добавляли в экспланты в эквивалентных концентрациях в качестве контроля. При этом оценивали спонтанную миграцию клеток (общее число промигрировавших из эксплантов в Матригель клеток) и скорость клеточной миграции (длина миграционного пути). Было обнаружено, что добавление uPA не только активирует ($P < 0.05$) спонтанную миграцию сосудистых клеток (число промигрировавших клеток на рис. 8, а), но также увеличивает скорость миграции (длина миграционного пути на рис. 8, б). Общее число клеток, а также скорость миграции клеток в эксплантах аорты, полученных от PLAУ-мышей, были существенно ниже, чем в контроле ($P < 0.05$). При этом блокирование урокиназного рецептора оказывало статистически значимый эффект

на оба этих процесса: снижалась как спонтанная миграция клеток, так и скорость миграции клеток в эксплантах, полученных от PLAУ-мышей, по сравнению с контролем ($P < 0.05$) (anti-uPAR на рис. 8). По-видимому, стимулирующие эффекты урокиназы, которые она оказывает на миграцию сосудистых клеток, обусловлены ее специфическим взаимодействием со своим рецептором uPAR.

Таким образом, при изучении роли урокиназной системы в регуляции миграции клеток, направленного роста и ветвления капилляроподобных структур на модели сосудистого колечка *ex vivo* было обнаружено, что миграция ГМК зависит от экспрессии урокиназной системы: урокиназа активирует миграцию ГМК и увеличивает скорость миграции, блокирование uPAR тормозит оба этих процесса. При блокировании uPAR усиливается ветвление капилляроподобных структур, образованных эндотелиальными клетками, и происходит потеря промигранторного фенотипа ГМК.

Обсуждение

Актуальной проблемой на сегодняшний день является идентификация молекулярных механизмов регуляции роста сосудов и формирования разветвленной сосудистой сети. Васкуляризация, как и иннервация, является неотъемлемой частью морфогенеза и регенерации тканей и органов, полноценное восстановление функции которых невозможно без восстановления их кровоснабжения. Идентификация молекулярных механизмов, регулирующих процессы ангиогенеза, необходима не только для понимания морфогенеза и регенерации, но в том числе и для разработки способов эффективного управления ими. Разработка таких способов невозможна без решения такой фундаментальной задачи, как наиболее полная расшифровка механизмов, регулирующих рост и формирование сосудов. Понимание этих механизмов необходимо также и для развития тканевой и органной инженерии.

Результаты, полученные нами ранее, свидетельствуют о том, что урокиназа является ключевым регулятором

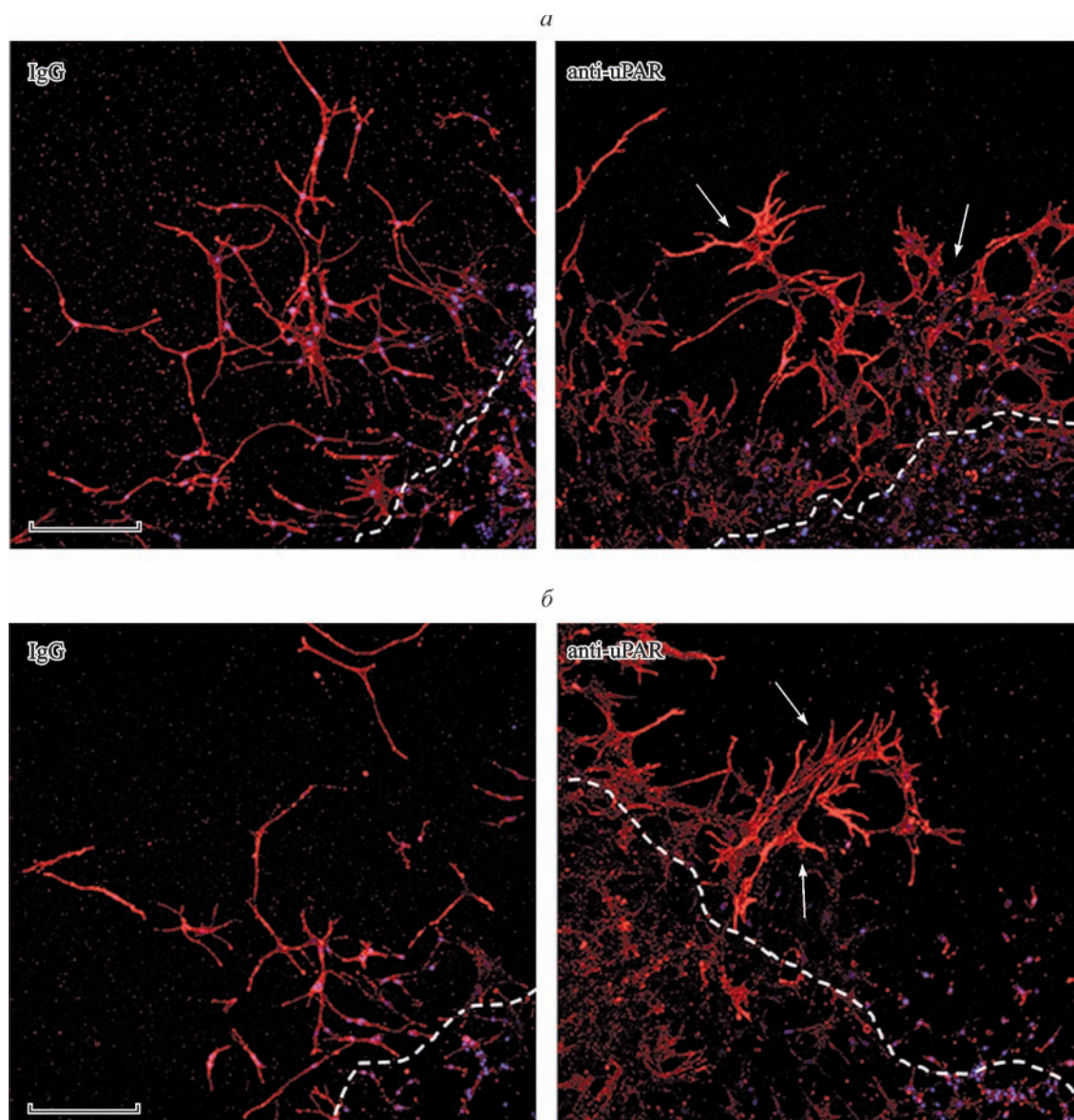


Рис. 7. Изменение фенотипа гладкомышечных клеток (ГМК) при блокировании uPAR (anti- uPAR).

Экспланты аорты от контрольных мышей (а) и мышей, лишенных гена урокиназы (б), зафиксированы и окрашены с использованием антител к α -SMA для выявления ГМК (красная флуоресценция). Ядра докрашены DAPI (синяя флуоресценция). Стрелками показаны распадавшиеся ГМК на фоне блокирования uPAR. Остальные обозначения те же, что и на рис. 6.

ангиогенеза (Парфенова и др., 2002; Ткачук и др., 2013). На экспериментальных животных моделях ишемии задней конечности и инфаркта миокарда были продемонстрированы стимулирующие ангиогенез эффекты при введении плазмидной конструкции для экспрессии урокиназы (Traktuev et al., 2007). Было показано, что uPA стимулирует формирование капилляров и артериол, уменьшает размер инфаркта и предотвращает развитие некроза в ишемизированной конечности. Считается, что урокиназа стимулирует реваскуляризацию за счет участия в процессах внеклеточного протеолиза и ремоделирования тканей благодаря активации латентных или депонированных во внеклеточном матриксе ангиогенных факторов, активации матриксных металлопротеиназ, стимуляции миграции и пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, а также за счет привлечения моноцитов (Парфенова и др., 2002). In vitro увеличение экспрессии урокиназы в эндотелиальных клетках

повышает их инвазивный потенциал; использование рекомбинантной формы урокиназы, лишенной протеолитической активности, подавляет миграцию эндотелиальных клеток в культуре и формирование ими капилляроподобных структур на Матригеле (Basire et al., 2006; Traktuev et al., 2007).

Данные, полученные в настоящей работе с использованием трехмерной модели эксплантов аорты ex vivo, коррелируют с данными литературы: урокиназа необходима для миграции сосудистых клеток, поскольку у PLAУ-мышей с «выключенным» геном урокиназы скорость миграции существенно снижена по сравнению с контролем. Следует отметить, что у PLAУ-мышей снижен и уровень экспрессии урокиназного рецептора, что, возможно, также вносит свой вклад в снижение миграционного потенциала клеток из этих эксплантов.

Ранее было показано, что использование антител, блокирующих урокиназный рецептор, подавляет ангио-

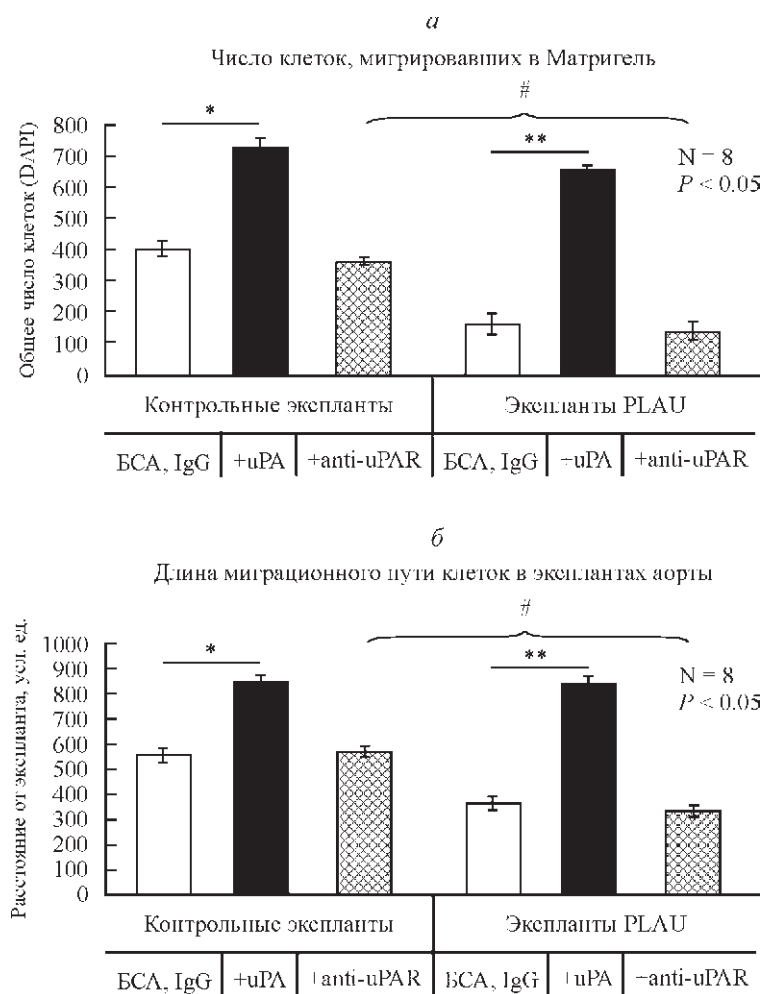


Рис. 8. Стимуляция урокиназой спонтанной миграции (а) и скорость миграции (б) сосудистых клеток.

Представлены результаты статистического подсчета числа клеток (а) и средней длины миграционного пути клеток (б), мигрировавших из эксплантов аорты в Матригель на 14-е сут после начала эксперимента. Добавление урокиназы (+uPA) стимулирует миграцию и скорость миграции клеток в обоих типах эксплантов по сравнению с контролем (БСА, IgG); звездочки показывают достоверность различий, $P < 0.05$. Блокирование uPAR (anti-uPAR) значительно снижает спонтанную миграцию и скорость миграции (сравнение клеток, мигрировавших из эксплантов без урокиназы, с контрольными эксплантами (показано *решеткой*, $P < 0.05$). Представлен статистически значимый результат подсчета восьми эксплантов.

генные эффекты факторов роста, таких как фактор роста фибробластов (bFGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), на миграцию эндотелиальных клеток и формирование ими капиллярподобных структур в фибриновом матриксе (Kroon et al., 1999). В отличие от этих данных наши результаты свидетельствуют о том, что блокирование рецептора uPAR не влияет на миграцию эндотелиальных клеток из эксплантов, однако значительно подавляет миграцию ГМК и вызывает изменение их фенотипа с промигранторного на распластаный.

Если роль uPA и ее рецептора в ремоделировании сосудов и ангиогенезе достаточно хорошо охарактеризована, то механизмы навигационной функции рецептора урокиназы, определяющие траекторию роста сосудов, практически не изучены. В настоящей работе впервые показано, что при блокировании uPAR происходит увеличение степени ветвления капиллярподобных структур. Ангиогенез представляет собой многоступенчатый процесс формирования новых функциональных сосудов и капилляров из предсуществующих. На начальном этапе происходят активация эндотелиальных клеток, экспрессия в них протеаз, деградация внеклеточного матрикса, пролиферация и миграция клеток, приводящая к форми-

рованию сосудистого отростка. В дальнейшем вновь сформированные сосудистые структуры стабилизируются за счет привлечения перicyтов и ГМК и формируют сложную трехмерную функционально зрелую сосудистую сеть (Парфенова, Ткачук, 2007). На начальных этапах ангиогенеза под действием ангиогенных факторов происходит клеточная специализация: лишь одна из многих эндотелиальных клеток становится «tip-клеткой», в соседних клетках этот фенотип подавляется и формируется «stalk-фенотип». Именно tip-клетки преобразуют комбинации различных навигационных сигналов микроокружения в направленную миграцию следующих за ними stalk-клеток, tip-клетки определяют направление роста всего сосуда и место последующих ветвлений (De Smet et al., 2009). Тот факт, что блокирование урокиназного рецептора приводит к увеличению степени ветвления формирующихся капиллярподобных CD31-позитивных структур в эксплантах аорты, может отражать нарушение tip/stalk клеточной специализации эндотелиальных клеток или утрату способности tip-клетками адекватно распознавать навигационные сигналы микроокружения. Подтверждение этого предположения нуждается в проведении дальнейших исследований.

Таким образом, в настоящей работе, используя модель эксплантной культуры аорты мыши *ex vivo*, мы показали, что у животных, нокаутированных по гену урокиназы, блокирование uPAR приводит к распластыванию ГМК и нарушению их направленного движения. Мы предположили, что этот процесс зависит не только от uPA, но и от ее рецептора, так как нокаут по урокиназе у мышей uPA^{-/-} снижает экспрессию урокиназного рецептора, и такое совместное действие урокиназы и рецептора приводит к изменению фенотипа ГМК и снижению их миграторного потенциала. Помимо влияния урокиназной системы на ГМК наблюдается увеличение ветвления капиллярноподобных CD31-позитивных структур, что может отражать утрату способности эндотелиальных клеток распознавать навигационные сигналы микроокружения.

Нами впервые показан фундаментальный механизм регуляции траектории роста и ветвления кровеносных сосудов с участием урокиназной системы, который может иметь важное значение как для процессов роста сосудов в раннем эмбриогенезе, так и во взрослом организме при репарации (регенерации) тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда научных исследований (проект 14-24-00086) и при использовании оборудования, приобретенного за счет средств программы развития Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Список литературы

- Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Меньшиков М. Ю., Степанова В. В., Ткачук В. А. 2009. Регуляция роста и ремоделирования кровеносных сосудов: уникальная роль урокиназы. *Рос. физиол. журн.* 95(5) : 442—464. (Parfyonova Ye., Plekhavova O., Menshikov M., Stepanova V., Tkachuk V. 2009. The regulation of growth and remodeling of blood vessels: the unique role of urokinase. *Russ. Physiol. J.* 95(5) : 442—464.)
- Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Ткачук В. А. 2002. Система активаторов плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенезе. *Биохимия.* 67(1) : 119—134. (Parfyonova Y., Plekhanova O., Tkachuk V. 2002. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochemistry (Moscow).* 67(1) : 119—134.)
- Парфенова Е. В., Ткачук В. А. 2007. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. *Кардиологический вестник.* 2 : 5—15. (Parfenova E., Tkachuk V. 2007. Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects. *Kardiologichesky vestnik.* 2 : 5—15.)
- Степанова В. В., Белоглазова И. Б., Гурский Я. Г., Бибилашвили З. Ш., Парфенова Е. В., Ткачук В. А. 2008. Взаимодействие между крингл- и ростовыми доменами в молекуле уретазы: возможная роль в стимуляции хемотаксиса клеток. *Биохимия.* 73(3) : 311—321. (Stepanova V., Beloglazova I., Gursky Y., Bibilashvili Z., Parfyonova Y., Tkachuk V. 2008. Interaction between kringle and growth-factor-like domains in the urokinase molecule: possible role in stimulation of chemotaxis. *Biochemistry (Moscow).* 73(3) : 252—260.)
- Ткачук В. А., Плеханова О. С., Белоглазова И. Б., Парфенова Е. В. 2013. Роль мультидоменной структуры урокиназы в регуляции роста и ремоделирования сосудов. *Укр. биохим. журн.* 85(6) : 18—45. (Tkachuk V., Plekhavova O., Beloglazova I., Parfyonova Ye. 2013. The role of the multi-domain structure of urokinase in the regulation of growth and vascular remodeling. *Ukr. Biochem. J.* 85(6) : 18—45.)
- Basire A., Sabatier F., Ravet S., Lamy E., Mialhe A., Zambou G., Paul P., Gurewich V., Sampol J., Dignat-George F. 2006. High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors. *Thromb. Haemost.* 95 : 678—688.
- Behrendt N. 2004. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180) : membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol. Chem.* 385 : 103—136.
- Blasi F., Carmeliet P. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3 : 932—943.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6 : 389—395.
- Carmeliet P. 2003. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nature Rev. Gen.* 4 : 710—720.
- Carriero M., Franco P., Votta G., Immacolata L.-C., Vento M.-T., Masucci M., Mancini A., Caputi M., Iaccarino I., Stoppelli M. 2011. Regulation of cell migration and invasion by specific modules of uPA: mechanistic insights and specific inhibitors. *Curr. Drug Targets.* 12 : 1761—1771.
- Collen D. 1999. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb. Haemost.* 82 : 259—270.
- Colombo E., Menicucci G., McGuire P., Das A. 2007. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes retinal angiogenesis through increased urokinase expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 : 1793—1800.
- De Smet F., Segura I., De Bock K., Hohensinner P., Carmeliet P. 2009. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *ATVB.* 29 : 639—649.
- Falkenberg M., Tom C., DeYoung M., Wen S., Linnemann R., Dichek D. 2002. Increased expression of urokinase during atherosclerotic lesion development causes arterial constriction and lumen loss, and accelerates lesion growth. *PNAS.* 99 : 10 665—10 670.
- Franco P., Vocca I., Carriero M., Alfano D., Cito L., Longanesi-Cattani I., Grieco P., Ossowski L., Stoppelli M. 2006. Activation of urokinase receptor by a novel interaction between the connecting peptide region of urokinase and avb5 integrin. *J. Cell Sci.* 119 : 3424—3434.
- Gardsvoll H., Gilquin B., Le Du M. H., Ménéz A., Jorgensen T. J., Ploug M. 2006. Characterization of the functional epitope on the urokinase receptor. Complete alanine scanning mutagenesis supplemented by chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* 281 : 19 260—19 272.
- Goretzki L., Mueller B. 1998. Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem. J.* 336 : 381—386.
- Herbert J., Lamarche I., Carmeliet P. 1997. Urokinase and tissue-type plasminogen activator are required for the mitogenic and chemotactic effects of bovine fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB for vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 72 : 23 585—23 591.
- Heymans S., Lutun A., Nuyens D., Theilmeier G., Creemers E., Moons L., Dyspersin G., Cleutjens J. P., Shipley M., Angellilo A., Levi M., Nube O., Baker A., Keshet E., Lupu F., Herbert J., Smits J., Shapiro S., Baes M., Borgers M., Collen D., Daelen M., Carmeliet P. 1999. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat. Med.* 5 : 1135—1142.
- Kroon M., Koolwijk P., van Goor H., Weidle U., Collen A., van der Pluijm G., van Hinsbergh V. 1999. Role and localization of uPAR in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. *Amer. J. Pathol.* 154 : 1731—1742.
- Melani M., Weinstein B. 2010. Common factors regulating patterning of the nervous and vascular systems. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 26 : 639—665.
- Menshikov M., Plekhanova O., Cai H., Chalupsky K., Parfyonova Y., Bashtrikov P., Tkachuk V., Berk B. C. 2006. Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via redox-dependent pathways. *ATVB.* 26 : 801—807.
- Nicosia R., Ottinetti A. 1990. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *Vitro Cell Dev. Biol.* 26 : 119—128.

Plekhanova O., Berk B., Bashtrykov P. 2009. Oligonucleotide microarrays reveal regulated genes related to inward arterial remodeling induced by urokinase plasminogen activator. *J. Vasc. Res.* 46 : 177—187.

Resnati M., Guttinger M., Valcamonica S., Sidenius N., Blasi F., Fazioli F. 1996. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* 15 : 1572—1582.

Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova E. 2009. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng. Part A.* 15 : 2039—2050.

Rubina K., Kalinina N., Potekhina A., Efimenko A., Semina E., Poliakov A., Wilkinson D., Parfyonova E., Tkachuk V. 2007. T-cadherin suppressed angiogenesis *in vivo* by inhibiting migration of endothelial cells. *Angiogenesis.* 10 : 183—195.

Tang H., Kerins D., Hao Q., Inagami T., Vaughan D. 1998. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273 : 18 268—18 272.

Tkachuk V., Stepanova V., Little P. J., Bobik A. 1996. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23 : 759—765.

Traktuev D., Tsokolaeva Z., Shevelev A., Talitskiy K., Stepanova V., Johnstone B., Rahmat-Zade T., Kapustin A., Tkachuk V., March K., Parfyonova Y. 2007. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol. Ther.* 15 : 1939—1946.

Поступила 16 VI 2015

UROKINASE SYSTEM INVOLVES IN VASCULAR CELLS MIGRATION AND REGULATES THE GROWTH AND BRANCHING OF CAPILLARIES

E.V. Semina, K. A. Rubina,¹ V. Yu. Sysoeva, P. I. Makarevich, Ye.V. Parfyonova, V. A. Tkachuk

Faculty of Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192;
e-mail: rkseniya@mail.ru

Urokinase system representing urokinase-type plasminogen activator (urokinase, uPA) and urokinase receptor (uPAR) plays an important regulatory role in the vascular wall and has the ability to run a proteolytic cascade, degradation of extracellular matrix and activate intracellular signaling in vascular cells. In this work, we have firstly shown a fundamental mechanism of urokinase system-dependent regulation of the trajectory of growth and branching of blood vessels what may be of particular importance in the growth of blood vessels in early embryogenesis and in adults during the repair/regeneration of tissues.

Key words: urokinase, urokinase receptor, angiogenesis, guidance receptors, vessel sprouting.