

МАЛЬЦЕВА

Ольга Николаевна

**РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК И ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В
РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА
ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ *IN VITRO***

1.5.22 – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2022

Работа выполнена в Отделе иммунологии и Отделе биохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»).

Научный руководитель:

Денисенко Александр Дорوفеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией регуляции липидного обмена отдела биохимии ФГБНУ «ИЭМ».

Официальные оппоненты:

1. Меньшиков Игорь Викторович – доктор биологических наук, профессор кафедры иммунологии и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск.

2. Сердюков Дмитрий Юрьевич – доктор медицинских наук, старший преподаватель кафедры госпитальной терапии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится: «21» февраля 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д.71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, и на сайте: <http://iemsph.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Алешина Галина Матвеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Сердечно-сосудистые заболевания, в первую очередь атеросклероз и его осложнения, являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения в развитых странах. Атеросклероз является системным заболеванием, при котором поражаются крупные и средние артерии мышечно-эластического типа, что приводит к нарушению кровоснабжения жизненно важных органов. Ключевым событием атерогенеза является очаговое увеличение транспорта липопротеинов из плазмы крови в интиму артерий. Причины и механизмы данного феномена остаются не выясненными. Повышение трансэндотелиального транспорта аполипопротеин В-содержащих липопротеинов приводит к их накоплению в интиме с последующей модификацией и индукцией асептического воспаления. Поэтому в терапии и профилактике атеросклеротических поражений артерий центральное место занимает ограничение поступления липопротеинов в стенку артерий.

В связи с тем, что воспаление играет важнейшую роль в патогенезе атеросклероза, можно предположить, что некоторые из многочисленных биологически активных агентов, секретируемых клетками, участвующими в воспалении, в том числе и тучными клетками (ТК), могут влиять на скорость проникновения плазменных липопротеинов в интиму. Известно, что ТК содержат большое количество биологически активных веществ и воспалительных агентов, таких как нейтральные протеазы, гепарин, цитокины (фактор некроза опухолей (TNF) α , интерферон- γ , интерлейкины), гистамин и другие. ТК обнаружены в интиме и особенно в адвентиции пораженных атеросклерозом сонных и коронарных артерий [Kovanen et al, 2019], однако их влияние на состояние сосудистой стенки и на атерогенез практически не исследовано. Наибольший интерес представляет изучение влияния ТК на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), тем более, что роль ТК в повышении проницаемости капилляров и венул хорошо известна.

В связи с этим, установление роли ТК и их продуктов в регуляции трансэндотелиального транспорта белковых молекул и липопротеинов является актуальной научной задачей и будет способствовать углублению представлений о механизмах атерогенеза.

Степень разработанности темы. ТК, встречающиеся практически во всех соединительных тканях (кроме хрящевой и костной), располагаются обычно вблизи кровеносных и лимфатических сосудов [Chatterjee et al, 2012]. Очаги скопления ТК были обнаружены в интиме на поздних стадиях образования атеросклеротических поражений, в основном, неподалеку от бляшек и в областях их ранней кальцификации [Jeziorska et al, 1997].

Цитоплазма зрелых ТК более чем на 40 % заполнена гранулами. Основными компонентами гранул являются нейтральные протеазы (триптаза и/или химаза) и гепарин [He et al, 2004]. Кроме того, гранулы ТК содержат также биологически активные вещества с регуляторными свойствами: гистамин, серотонин, дофамин, хемотаксический фактор нейтрофилов, фактор активации тромбоцитов, нейропептиды, хемоаттрактанты нейтрофилов, иммунорегуляторные цитокины, факторы роста и многие другие [Кондашевская и др., 2000]. Высвобождая содержимое гранул в ответ на различные экзогенные сигналы, ТК способны воздействовать на соседние клетки и их микроокружение.

Предполагается, что периваскулярные, а также интимальные ТК вносят существенный вклад в патогенез атеросклероза и дестабилизацию бляшек [Bot et al, 2008]. Имеются сведения, что увеличение количества ТК в адвентиции коронарных

артерий связано с развитием вазоспазмов [Forman et al, 1985]. Предполагается, что это объясняется способностью секретируемых ТК гистамина, простагландина D2 и лейкотриенов влиять на функцию эндотелиальных клеток и вазореактивность.

Гистамин хорошо известен как регулятор вазодилатации и функции эндотелиальной клетки [Walia et al, 2012]. Отмечено увеличение уровней гистамина в коронарных артериях пациентов с ишемической болезнью сердца и повышенными уровнями гистамина в циркуляции у пациентов с вариантной стенокардией [Sakata et al, 1996, Kalsner et al, 1984].

Гистамин повышает проницаемость венул, вызывая увеличение промежутков между эндотелиальными клетками [Heltianu et al, 1982]. Повышение проницаемости носит временный характер и длится всего несколько минут при непрерывном действии гистамина [Wu et al, 1992]. Свои эффекты гистамин реализует через семейство из четырёх различных рецепторов, связанных с G-белками, – H₁R, H₂R, H₃R и H₄R [Walia et al, 2012]. На сосудистой эндотелии экспрессируется H₁-рецептор, он ответственен за сосудистые эффекты гистамина [Heltianu et al, 1982].

Выброс гистамина вызывает быстрое увеличение проницаемости сосудов. В первые минуты гистамин эффективно увеличивает проницаемость эндотелия, но через 15 мин уже запускается обратный процесс, — нормализация проницаемости. К примеру, при воздействии гистамина на венулы брыжейки крысы, проницаемость первоначально увеличивалась в среднем в пять раз, достигая пика примерно к третьей минуте, а затем постепенно снижалась до исходного уровня. Таким образом, эффект гистамина реализуется довольно быстро, но также быстро прекращается [Wu et al, 1992]. Время полураспада гистамина составляет примерно 1 мин [Kunder et al, 2011]. Эта особенность действия гистамина важна для сохранения белков плазмы внутри сосудов. Гистаминовый рецептор H₁ наиболее широко представлен на эндотелиальных клетках вен и именно он опосредует большинство острых сосудистых эффектов гистамина.

И хотя гистамин является в первую очередь медиатором аллергического воспаления, однако и гистамин, и его рецепторы обнаруживаются на клетках в атеросклеротических поражениях [Wang et al, 2011]. Было показано, что гистамин вызывает изменения формы культивируемых эндотелиальных клеток, усиливает мобильность и ускоряет рост клеток и продукцию простагландина [Marcelino da Silva et al, 2014].

Несмотря на то, что действие гистамина кратковременно, но оно может быть значительно пролонгировано в условиях хронического воспаления. Однако особенности действия гистамина на эндотелиальные клетки при продолжительных сроках воздействия практически не изучены.

В доступной нам литературе отсутствуют сведения о влиянии секретируемых ТК веществ на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов, в частности, наиболее атерогенных ЛПНП. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что липопротеиновые частицы пересекают эндотелиальный слой трансцеллюлярно, а не через межклеточные промежутки.

В связи с этим, представляется важным выяснить роль тучных клеток и секретируемых ими медиаторов воспаления в регуляции проницаемости эндотелия для ряда белков и липопротеинов, а также установить пути их трансэндотелиального транспорта.

Целью настоящего исследования являлось установление роли ТК и факторов воспаления в регуляции трансэндотелиального транспорта ЛПНП.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Адаптировать двухкамерную клеточную модель для оценки трансэндотелиального транспорта ЛПНП и влияния на него факторов воспаления в экспериментах *in vitro*, а также разработать модель

кокультивирования *in vitro* эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и ТК человека линии НМС-1 в двухкамерных сосудах для оценки трансэндотелиального транспорта ЛПНП.

2. В экспериментах *in vitro* изучить влияние медиаторов воспаления TNF α и гистамина, а также С-реактивного белка (CRP) на трансэндотелиальный транспорт некоторых белков и липопротеинов плазмы крови.
3. Оценить эффект активированных и интактных ТК на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП.

Научная новизна. С использованием эндотелиальных клеток линии EA.hy926 инкубированных в двухкамерной системе было изучено влияние некоторых факторов воспаления (TNF α и CRP) на трансэндотелиальный транспорт плазменных белков и липопротеинов. Эта же двухкамерная система была впервые использована для кокультивирования тучных и эндотелиальных клеток, что позволило оценить влияние ТК на трансэндотелиальный транспорт различных веществ. На указанной модели, было установлено, что транспорт ЛПНП через эндотелий осуществляется с участием клатрин- и кавеолин-зависимого трансцитоза.

Выявлен двухфазный характер влияния гистамина на проницаемость эндотелия: быстрое, но кратковременное повышение проницаемости, которое сменяется фазой длительного снижения проницаемости монослоя эндотелиальных клеток.

Впервые было показано, несмотря на то, что продуцируемый ТК провоспалительный цитокин TNF α активирует трансэндотелиальный транспорт ЛПНП, сами ТК, как активированные, так и интактные, подавляли этот процесс. Доказана ключевая роль гистамина в реализации эффекта ТК на трансэндотелиальный транспорт. Установлено, что увеличение транспорта ЛПНП через монослой эндотелиальных клеток линии EA.hy926 под влиянием провоспалительного цитокина TNF α связано с активацией последним JNK-протеинкиназного сигнального пути.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы предоставляют новые данные о молекулярно-клеточных механизмах патогенеза атеросклероза. В частности, установлено, что активирующее влияние таких агентов системного воспаления как CRP и TNF α на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП, может, по крайней мере частично, компенсироваться присутствующими в интима ТК и секретлируемым этими клетками гистамином.

Полученные данные позволяют рассматривать ТК и их медиаторы как фактор, оказывающий влияние на атерогенез, в частности на скорость поступления ЛПНП в интиму артерий. Это открывает перспективы для влияния на этот патологический процесс, через модуляцию активности ТК, их медиаторов или рецепторов последних.

Сведения о регуляции транспорта ЛПНП через эндотелиальный монослой, полученные в данной работе, могут быть использованы в учебных программах курсов клеточной биологии, патофизиологии и биохимии.

Методология и методы исследования. В исследовании использован комплексный методический подход, включающий сочетание цитологических методов, в том числе, световой и конфокальной микроскопии, иммуногистохимии, оценки клеточного биоимпеданса, проточной цитофлуориметрии, культуральных клеточных технологий, с биохимическими, иммунологическими и микробиологическими методами исследований.

Статистическая обработка осуществлялась общепринятыми методами адекватными типу, характеру распределения и объёму полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Провоспалительные факторы CRP и TNF α , усиливают транспорт ЛПНП через монослой эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926.
2. TNF α в использованной клеточной модели действует через активацию JNK киназного пути. Транспорт ЛПНП через эндотелий в данной модели осуществляется с участием клатрин- и кавеолин-зависимого транспорта.
3. Влияние гистамина на проницаемость эндотелия имеет двухфазный характер: за ранней кратковременной фазой, характеризующейся повышением проницаемости, следует долговременная фаза торможения проницаемости. Эффект гистамина обусловлен взаимодействием его с рецепторами подтипа H₁, но не H₂.
4. Тучные клетки человека линии НМС-1 подавляют трансэндотелиальный транспорт ЛПНП в использованной клеточной модели. Влияние ТК на этот процесс обусловлено выбросом из них гистамина, и взаимодействием данного медиатора с H₁-рецепторами гистамина.

Личный вклад диссертанта заключался в анализе современной отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, в самостоятельном планировании и проведении экспериментов; обработке, анализе, интерпретации полученных данных с учетом результатов их статистической обработки; формулировании выводов; активном участии в написании статей и тезисов по теме работы, либо подготовке числовых, табличных и иллюстративных материалов для них.

Степень достоверности и апробация результатов. Апробация диссертации прошла на совместном научном заседании отделов биохимии, иммунологии и общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (СПб, РФ). Результаты отдельных этапов и основные положения в ходе работы были представлены на международных, всероссийских и зарубежных конференциях.

По материалам исследования опубликовано 16 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 13 тезисов в материалах конференций.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечены выбором адекватных, современных и широко применяемых в данной области исследования методов, корректной статистической обработкой полученных данных и подтверждены успешным представлением на тематических конференциях и публикацией в рецензируемых научных изданиях.

Объём диссертации составляет 126 страниц; она иллюстрирована 7 таблицами и 32 рисунками и включает стандартные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, его результаты, их обсуждение, заключение и выводы, а также список литературы из 242 наименования, среди которых 232 источника англоязычные и 10 русскоязычные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В работе использовалась линия клеток эндотелия человека EA.hy926 (адгезионная культура), полученные от д-ра Cora-Jean S. Edgell (Университет Северной Каролины, США), а также линия ТК НМС-1 (суспензионная культура).

Двухкамерная система для оценки трансэндотелиальной проницаемости состояла из 24-луночного планшета, в лунках которого были расположены вставки с пористым дном, засеянные эндотелиальными клетками.

Эндотелиоциты человека линии EA.hy926 (по 10^5 клеток на вставку) высевали на пористые вставки (Transwell, BD, США) с размером пор 1 мкм до образования конфлюэнтного монослоя. Вставки предварительно покрывались коллагеном I типа (Биолот, Россия).

Схема эксперимента: во вставки добавляли по 200 мкл культуральной среды DMEM с 5 % сывороткой человека (нормальная человеческая сыворотка в верхней камере служила как для поддержания питания клеток, так и в качестве источника исследуемых молекул), либо содержащей 200 мкг белка/мл, выделенных ЛПНП человека, и 200 мкг/мл очищенного альбумина человека (Sigma, США). В нижнюю камеру системы добавляли 700 мкл среды DMEM без сыворотки.

Описанная система использовалась для изучения транспорта белковых молекул (альбумин и IgM), а также липопротеинов низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности, содержащихся в нормальной человеческой сыворотке, в составе среды верхней камеры.

При изучении влияния на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов и альбумина в верхние камеры лунок добавляли различные факторы воспаления и/или ингибиторы гистаминовых рецепторов и ингибиторы сигнальных путей.

Инкубации обычно проводили в течение 2, 4, 8, 12 и 24 часов, а в опытах с гистамином – в течение 5, 10, 15, 20, 45 и 60 мин, после чего производили отбор проб из нижней камеры.

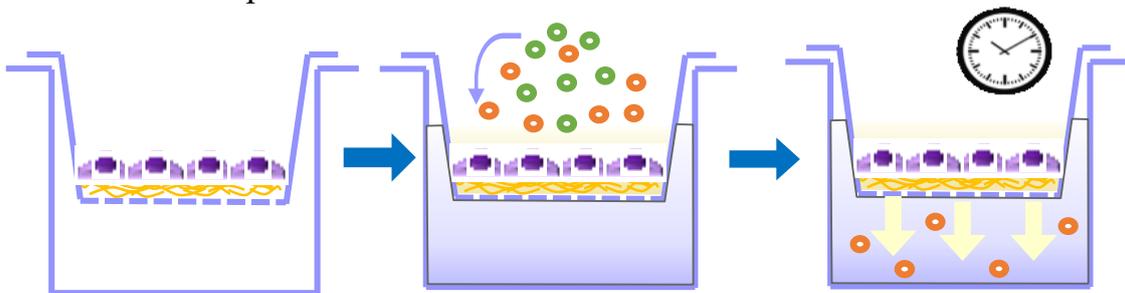


Рисунок 1. Схема рабочей модели культивирования клеток в двухкамерной системе

● факторы воспаления (очищенный С-реактивный белок человека, липополисахарид (ЛПС) *S. typhimurium*, гистамин, TNF α), ингибиторы гистаминовых рецепторов, ингибиторы сигнальных путей

○ исследуемые молекулы и надмолекулярные комплексы - альбумин, IgM, FITC-декстрана (70кДа), ЛПНП, ЛПВП

Активность трансэндотелиального транспорта белков рассчитывали, как отношение количества тестируемого белка в нижней камере к количеству соответствующего белка, добавленного в верхнюю камеру, и выражали в процентах.

Для совместного культивирования клеток адгезионной и суспензионной культур в вышеописанной модели в нижнюю камеру системы добавляли ТК линии НМС-1 по 10^6 клеток на 700 мкл среды. Для активации ТК перед добавлением в нижние камеры инкубировали в культуральной среде в течение 1 ч при 4°C (чтобы избежать преждевременной дегрануляции ТК) в присутствии раствора термоагрегированного (при 63°C , 10 мин) нормального IgG человека (Имтек, Россия) или с либератором гистамина - соединением 48/80 (полимер, полученный конденсацией из N-метил-p-метоксифенилэтиламина с формальдегидом; Sigma-Aldrich, США) [Пронина и др., 2011].

Исследование конфлюэнтности эндотелиального монослоя в верхней камере системы. Конфлюэнтность эндотелиального монослоя определяли с использованием FITC-декстрана (70кДа) [Galley et al, 2000]. А также при помощи

измерения показателя клеточного биоимпеданса на приборе: "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США). Величина биоимпеданса (электрического сопротивления) зависит от целостности монослоя и плотности межклеточных контактов. [Hagensen et al, 2012].

ЛПНП выделяли методом последовательного ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr (диапазон плотностей $d=1,0245-1,055$) в роторе 70,1Ti при 40000 об/мин в течение 22 ч на ультрацентрифуге «Beckman Optima L90-K». Содержание белка в ЛПНП определяли с помощью BCA реагента [Aird et al, 2007, Okada et al, 2017].

Концентрацию альбумина, АпоА-1, АпоВ, IgM, TNF α , ИЛ-8 и CRP измеряли с помощью иммуноферментного метода.

Для контроля гибели эндотелиальных клеток при воздействии факторов воспаления эндотелиальные клетки после проведения эксперимента снимали с пористой мембраны трансвелл раствором ацетазы (Gibco, Thermo Scientific, США). Далее отмывали средой DMEM и инкубировали со смесью красителей в соответствии с методом (1 и 2).

Метод 1: смесь PI (пропидиум иодид, окрашивает ДНК, Thermo Scientific, США) и YO-PRO-1 (карбоцианин иодид, проникает только в клетки с нарушенной проницаемостью мембраны, Thermo Scientific, США). Метод 2: смесь DRAQ7 (окрашивает ДНК в неживых клетках, Abcam, США) и TMRM (репортер потенциала внутренней мембраны митохондрий, окрашивает только живые клетки, Beckman Coulter, США). Клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США).

Подготовка эндотелиального монослоя к проведению конфокальной микроскопии для оценки захвата эндотелиальными клетками веществ.

После инкубации эндотелиального монослоя с различными веществами, и отмывки раствором гепарина в PBS клетки фиксировали 2% раствором параформальдегида в PBS 20 мин при +4 °C и окрашивали с помощью DAPI (Biolegend, США). Далее клетки исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leika TCS SPE LCSM в комбинации с аргоновым лазером и объективами 20X и 63X (Центр коллективного пользования «Конфокальная микроскопия», Институт Физиологии им. И.П. Павлова), или конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 META с объективами Plan-Apochromat 20X и 63X (Отдел молекулярной генетики, ФГБНУ ИЭМ) и их программного обеспечения.

Статистическая обработка данных. Предварительную обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Результаты цитометрического учета анализировали при помощи программы Kaluza (Beckman Coulter, США). Показатель клеточного биоимпеданса был проанализирован с помощью программного обеспечения прибора: "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США).

Для статистической обработки и определения различий между независимыми группами данных использовали программу GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США) (однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA). Для попарного сравнения использовали критерий Тьюки, либо критерий Даннета (при однофакторном анализе и сравнении показателя только с контролем), либо критерий Шидака (при двухфакторном анализе и сравнении показателя только с контролем). При оценке двух групп сравнения был применён критерий Стьюдента. В случаи нормального распределения данных применяли параметрические критерии. В случаи ненормального распределения данных применяли

непараметрический критерий Краскела - Уоллеса. Обозначены медиана и квартили, а также отличия от контрольной группы по апостериорному критерию Данна.

Данные на графиках представлены в виде среднего и среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка конфлюэнтности эндотелиального монослоя. Эндотелиальные клетки человека линии EA.hy926 растили на вставках, предварительно покрытых коллагеном первого типа для моделирования внутренней выстилки сосуда. По данным световой микроскопии, клетки после 3 суток культивирования образовывали плотный монослой на вставках в виде «булыжной мостовой» (Рисунок 2А), что согласуется с данными других авторов, полученными на клетках линии EA.hy926 [Gao et al, 2011] и на эндотелиоцитах аорты [Hough et al, 1990].

Конфлюэнтность клеточного монослоя подтверждалась также при визуализации межклеточных контактов с помощью специфических антител к CD144, также известному как VE-кадгерин. VE-кадгерин является основным компонентом адгезионных контактов эндотелиальных клеток [Wang et al, 2011]. Его экспрессия наблюдается в эндотелиальных клетках всех типов сосудов. Как видно на рисунке 2Б, клетки плотно смыкаются друг с другом, чётко просматриваются межклеточные контакты на протяжении всей сети эндотелиальных клеток.

Таким образом, микроскопическое исследование свидетельствует о формировании конфлюэнтного эндотелиального монослоя.

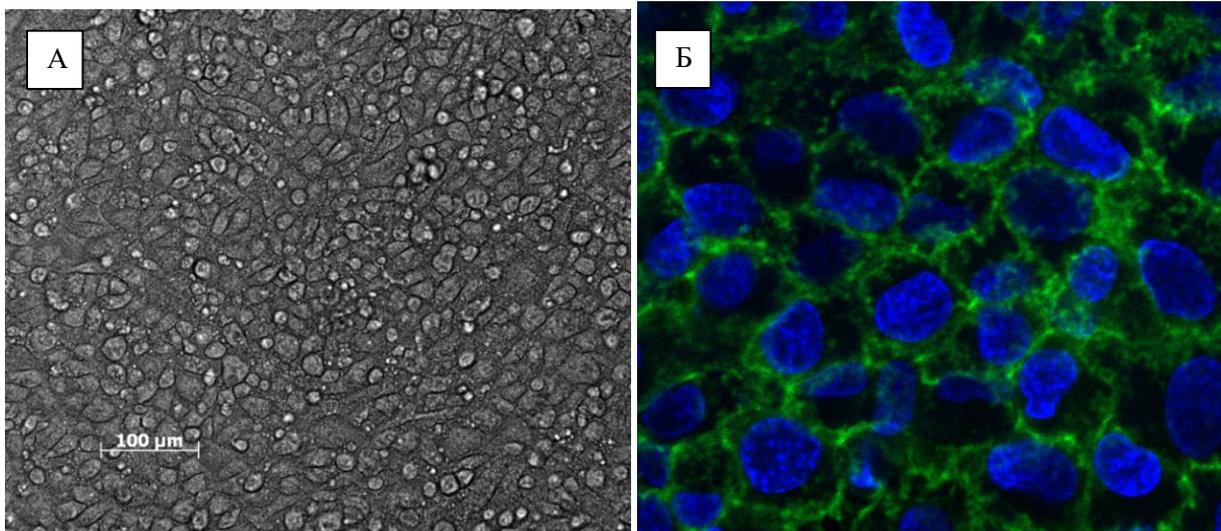


Рисунок 2. Конфлюэнтный монослой эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926. Инкубация в течение 72 ч.

А) Фазово-контрастная микроскопия, увеличение 10X (Zeiss, Observer.D1)

Б) Конфокальная микроскопия (ув. $\times 20$). Иммуногистохимия: определение VE-кадгерина (CD144 FITC) на эндотелиальных клетках EA.Hy926. Синий цвет – меченые DAPI ядра. Зелёный цвет - VE-кадгерин.

Об образовании конфлюэнтного монослоя эндотелиальных клеток EA.hy926 свидетельствуют и данные о скорости прохождения ФИТЦ-декстрана (70 кДа) через монослой. Известно, что ФИТЦ-декстран не захватывается клетками, а проходит через межклеточные промежутки [Kraehling et al, 2016]. Из рисунка 3 видно, что скорость прохождения ФИТЦ-декстрана через эндотелиальный монослой в сотни раз ниже по сравнению с контролем - вставок без эндотелиального монослоя.

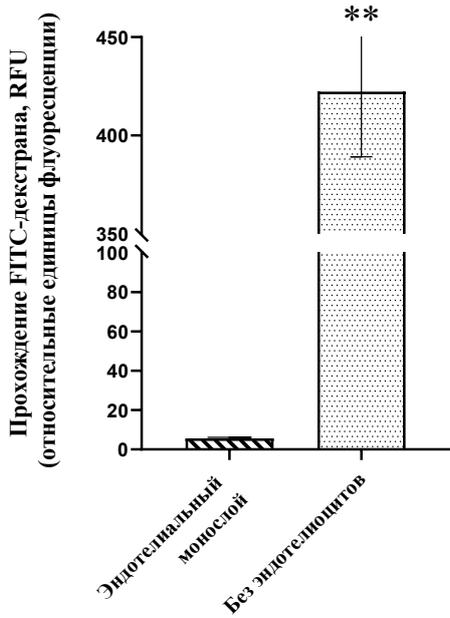


Рисунок 3. Оценка конфлюэнтности эндотелиального монослоя при помощи детектирования прошедшего FITC-декстрана (70кДа) в нижней камере системы (в % от добавленного в верхнюю камеру FITC-декстрана). Приведены средние \pm SD (n = 15). ** – p < 0,01 по сравнению с группой контроля, t-критерий Стьюдента.

Транспорт различных белков плазмы через монослой эндотелия. Для изучения транспорта различных белков плазмы через монослой эндотелия в верхнюю камеру системы добавлялась 5% сыворотка крови человека в среде ДМЕМ, либо отдельные белковые молекулы. Инкубация проводилась в течении 24 часов, при этом через определённые промежутки времени осуществлялся забор образцов из нижней камеры. Исследовался транспорт белков с различным молекулярным весом и размерами, такие как: альбумин (мол. вес 65000-70000 Да, диаметр 3 нм [Gryczynski et al, 2019]), IgM (мол. вес 970 кДа, диаметр 40 нм [Czajkowsky et al, 2009]) или: ЛПВП (диаметр 6-12 нм) и ЛПНП (диаметр 20-25 нм). Результаты представлены на рисунках 4 и 5.

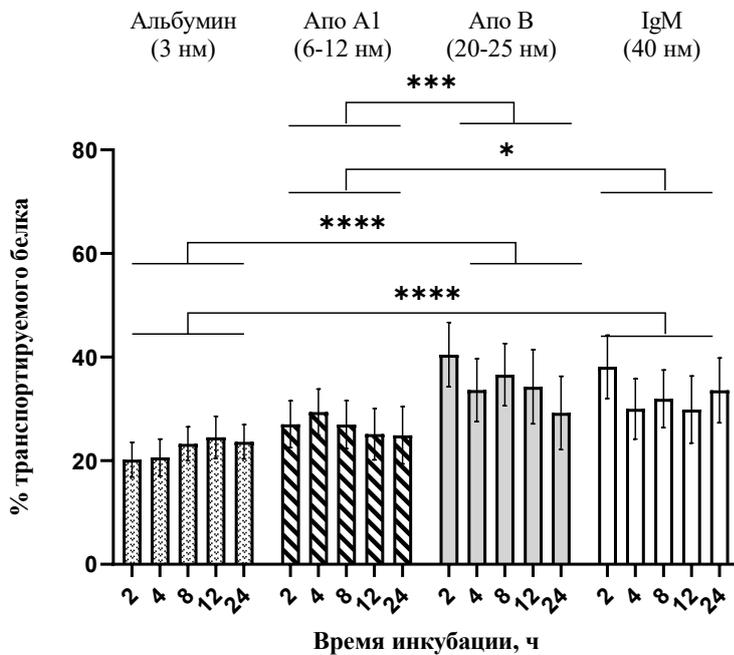


Рисунок 4. Прохождение белков и липопротеинов плазмы крови из верхней в нижнюю камеру системы через мембрану, покрытую коллагеном, но без эндотелиального монослоя (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 25-30). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный тест Тьюки. * – p < 0,05; *** – p < 0,001; **** – p < 0,0001.

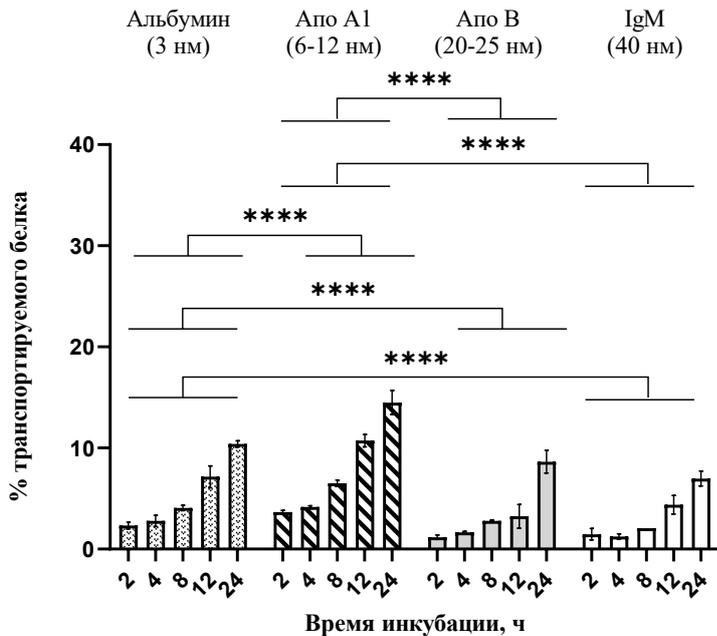


Рисунок 5. Транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через конфлюэнтный монослой эндотелиальных клеток (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 25-30). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный тест Тьюки. **** – p < 0,0001.

Транспорт липопротеинов оценивался по содержанию в нижней камере их главных аполипротеинов – апо А-1 для ЛПВП и апо В для ЛПНП. Следует отметить, что если апо В не может покинуть частицу ЛПНП и его появление в нижней камере отражает прохождение этих частиц через монослой клеток, то апо А-1 может диссоциировать с ЛПВП и находиться в сыворотке крови в свободном виде (молекулярный вес 28000 Да). Следовательно, появление в нижней камере апо А-1 может быть результатом поступления в нее как частиц ЛПВП, так и свободного апо А-1.

Как видно из представленных данных, эндотелиальный монослой в нашей модели проявляет выраженные барьерные свойства. В системе без эндотелиального монослоя (контроль) поступление исследуемых веществ в нижнюю камеру было довольно быстрым и достигало максимальных значений уже в течение 2 часов (25-40% от добавленных в верхнюю камеру) и мало изменялось в течение суток. При этом транспорт белков через вставки с эндотелием был значительно более медленным, он зависел от времени инкубации, по истечении 24 часов через монослой эндотелиальных клеток проходило до 15% белков, что соответствует литературным данным [Kim et al, 1994].

Трансэндотелиальный транспорт перечисленных белковых молекул достоверно различался между собой. Относительно мелкие белки (альбумин) проходили через монослой эндотелиальных клеток с большей скоростью по сравнению с более крупными белками IgM и апо В содержащими липопротеинами. При этом проницаемость для ЛПНП и IgM не отличались друг от друга. Обращает на себя внимание высокая скорость прохождения через монослой эндотелиальных клеток апо А-1. Как уже указывалось выше, это может быть связано с тем, что апо А-1 поступал в нижнюю камеру не в составе ЛПВП, а в свободном виде, а его молекулярный вес самый низкий из всех изучаемых веществ. Впрочем, нельзя исключить и более активный, по сравнению с другими изучаемыми веществами, специфический трансэндотелиальный транспорт ЛПВП. Интересно, что проницаемость эндотелия для маркера парацеллюлярного транспорта декстрана 70 кДа была значительно ниже, чем для альбумина, обладающего сходной молекулярной массой, что свидетельствует о трансцитозе изучаемых веществ.

Исследование механизмов трансэндотелиального транспорта белков и липопротеинов плазмы крови. Убаин (строфантин G) – является ингибитором натрий-калиевой-АТФ-азы. Известно, что этот фермент прочно связан с

кавеолином, и при ингибировании его убаином интернализуется совместно с кавеолином, что сопровождается угнетением кавеолин-зависимого эндоцитоза. Продолжительность его действия составляет 1-3 дня [Yosef et al, 2016, Rincon-Heredia et al, 2014]. Полученные результаты (Рисунок 6) говорят о том, что убаин снижает прохождение через эндотелиальный монослой апо А-1, альбумина и IgM. Это свидетельствует о том, что активный кавеолин-зависимый трансцитоз указанных белков вносит существенный вклад в их транспорт через монослой эндотелиальных клеток *in vitro*.

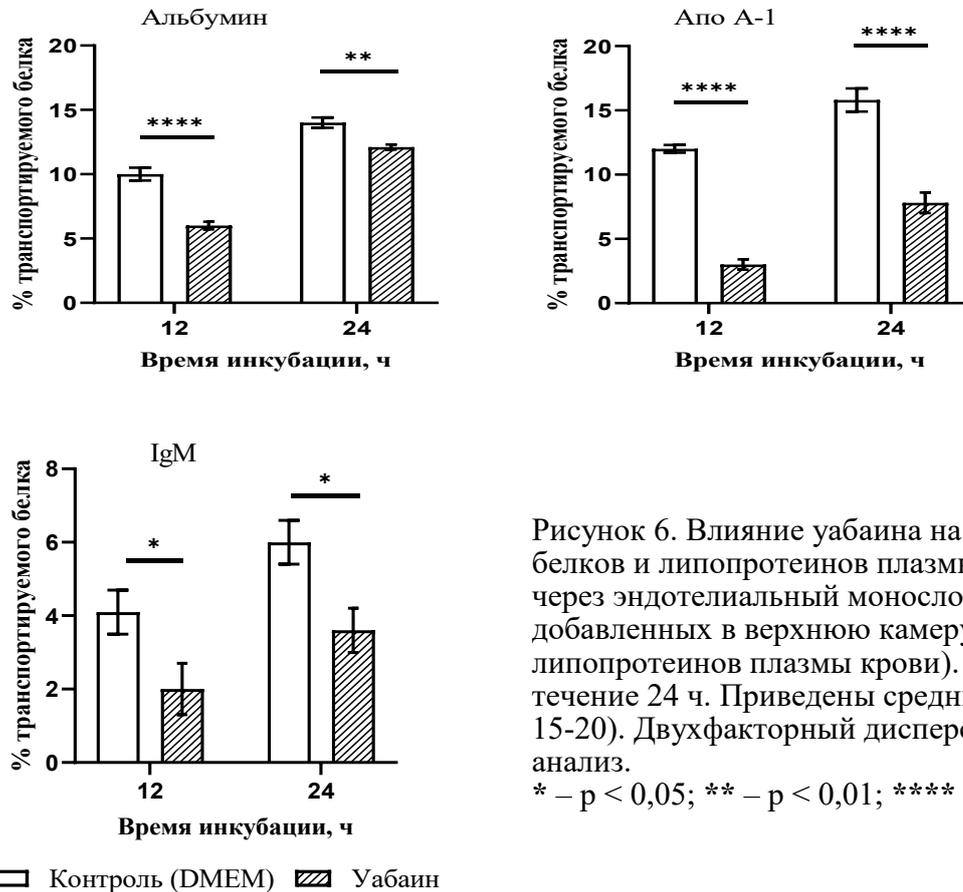


Рисунок 6. Влияние убаина на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 15-20). Двухфакторный дисперсионный анализ.

* – p < 0,05; ** – p < 0,01; **** – p < 0,0001

При рецептор-опосредованном эндоцитозе важную роль также играет клатрин. Клатрин представляет собой фибриллярный белок цитозоля, состоящий из трех ветвей (основными компонентами являются тяжёлые и лёгкие цепи клатрина), расположенных под определенным углом друг к другу, он способен к самосборке с формированием структур в виде "корзиночек" [Mukherjee et al, 1997].

Аминазин (хлорпромазин) - вещество, являющееся блокатором сборки клатриновых «корзиночек», которые требуются для трансцеллюлярного переноса молекул, что приводит к блокированию клатрин-опосредованного эндоцитоза [Dutta et al, 2012, Wang et al, 1993]. Как видно из рисунка 7, аминазин существенно снижал трансэндотелиальный транспорт альбумина, тогда как влияние аминазина на транспорт ЛПНП было незначительным. Эти данные свидетельствуют о существенной роли клатрина в транспорте альбумина через эндотелиальный монослой.

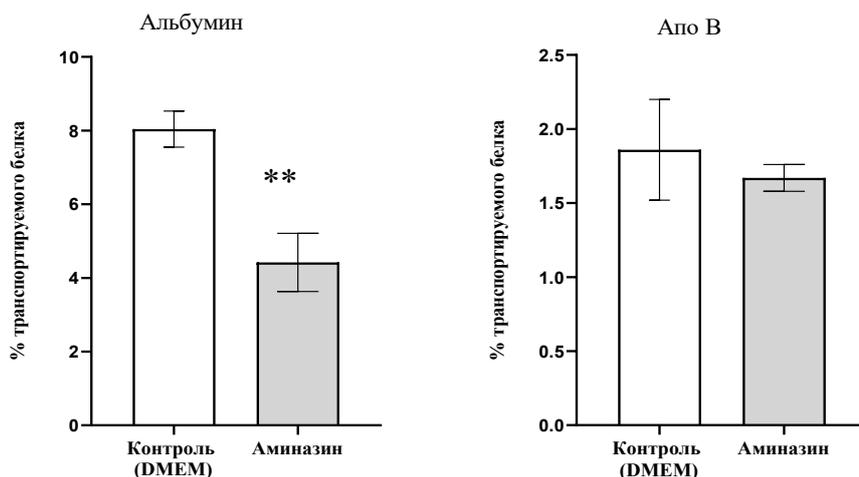
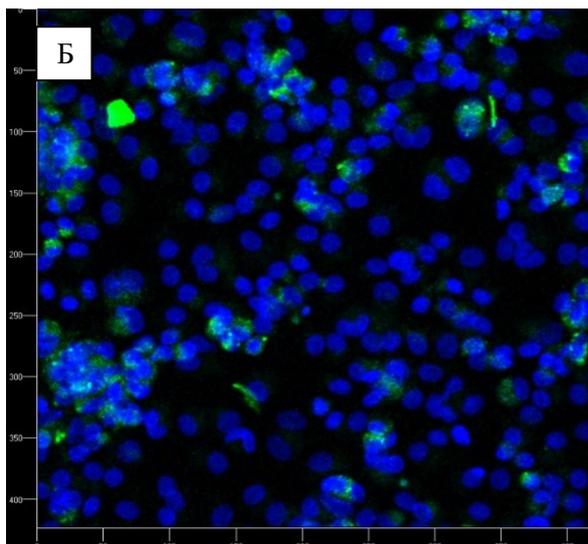
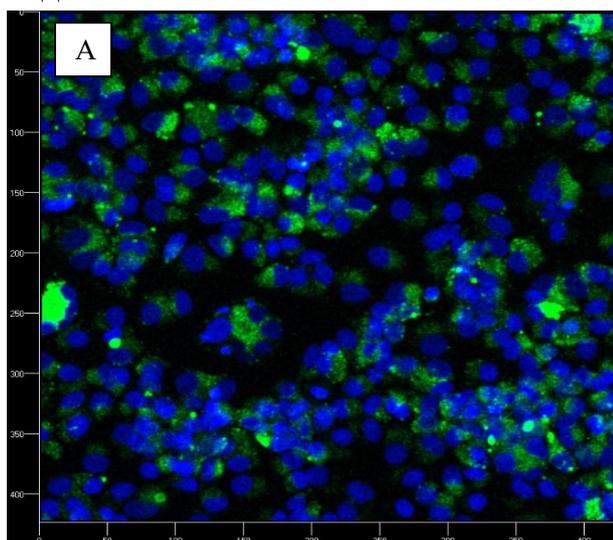


Рисунок 7. Влияние аминазина на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 15-20$). ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля, t-критерий Стьюдента.

Для выяснения роли клатрина и кавеолина в трансэндотелиальном транспорте различных веществ мы прибегли к методу конфокальной микроскопии. Было показано, что уже после 1 часа инкубации в среде с добавлением меченых альбумина или ЛПНП в клетках обнаруживались значительные количества изучаемых веществ. На микрофотографиях чётко видны ядра эндотелиальных клеток и очаговое накопление ЛПНП (Рисунок 8 А) альбумина (Рисунок 8 В) в цитоплазме, по-видимому, в эндоцитозных везикулах. Добавление в верхнюю камеру к клеткам аминазина приводило к уменьшению захвата ЛПНП и альбумина (Рисунок 8 Б и Г, соответственно). Таким образом, аминазин блокировал захват ЛПНП и альбумина эндотелиальными клетками, что позволяет говорить о клатрин-зависимом эндоцитозе как о возможном механизме транспорта молекул в эндотелиальных клетках.



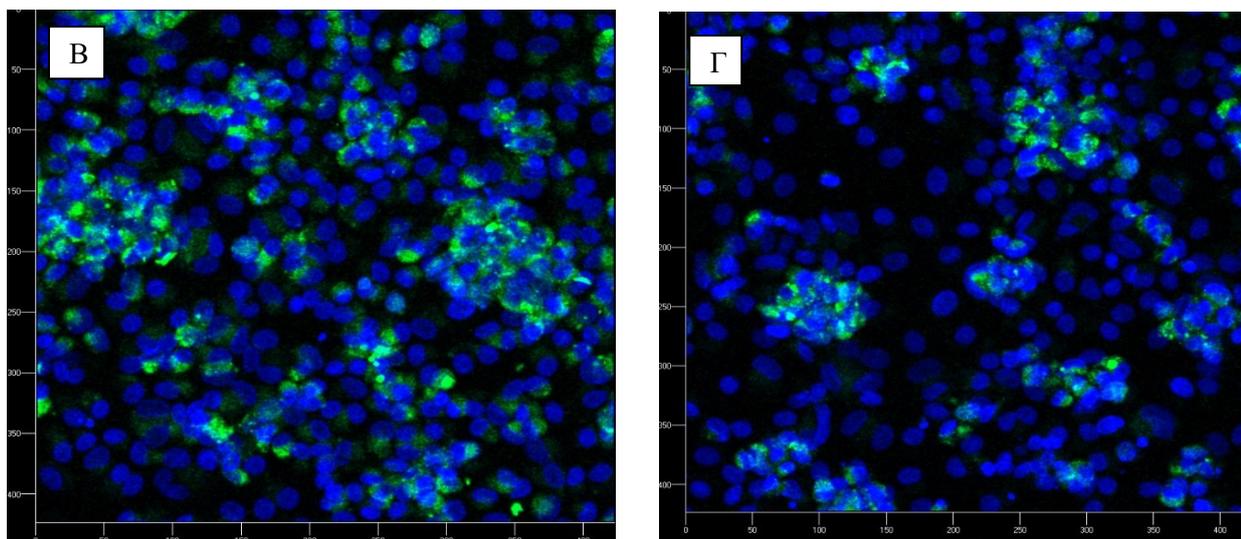


Рисунок 8. Захват эндотелиоцитами линии EA.hy926 меченых макромолекул (ЛПНП, альбумин) через 1 ч инкубации (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, ув. $\times 20$). Синий цвет – меченые DAPI ядра клеток, зелёный – меченые FITC макромолекулы. В отсутствие и присутствии ингибиторов транспорта. А – 50 мкг/мл FITC-ЛПНП; Б – 50 мкг/мл FITC-ЛПНП в присутствии 10 мкг/мл аминазина; В – 50 мкг/мл FITC-альбумин; Г – 50 мкг/мл FITC-альбумин в присутствии 10 мкг/мл аминазина.

Для подтверждения данных конфокальной микроскопии о захвате меченых макромолекул эндотелиальными клетками, а также для оценки действия ингибиторов на захват использовали метод проточной цитофлуориметрии.

Эндотелиальные клетки инкубировали с мечеными ЛПНП и ингибиторами различных путей эндоцитоза. Полученные результаты представлены на рисунке 9, показатель средней флуоресценции флуорохрома Су5 свидетельствует о количестве ЛПНП, поглощённых эндотелиоцитами в присутствии ингибиторов и без них (контроль). Аминазин достоверно снижал захват меченных ЛПНП, аналогичный эффект наблюдался при воздействии метилциклодекстрина (ингибитора кавеолина и клатрина).

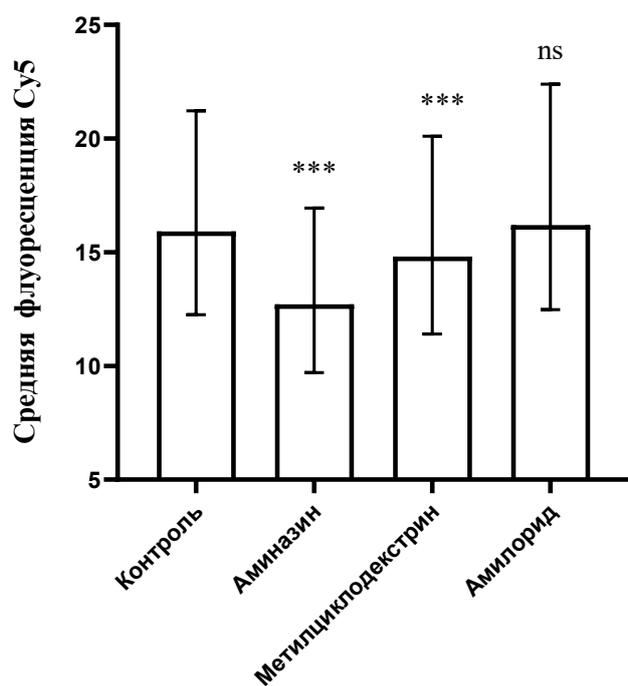


Рисунок 9. Влияние ингибиторов эндоцитоза на захват ЛПНП, меченых флуорохромом Су5 эндотелиальными клетками EA.hy926 (обозначены медиана и квантили, а также отличия от контрольной группы по апостериорному критерию Данна. *** $p < 0,001$, ns – недостоверно). Аминазин (ингибитор клатрина); метилциклодекстрин (ингибитор кавеолина и клатрина), амилорид (ингибитор пиноцитоза)

Основываясь на представленных выше результатах можно говорить о том, что трансэндотелиальный транспорт ЛПНП представляет собой активный процесс, требующий энергии и зависящий от процесса сборки и полимеризации клатрина и кавеолина, т.к. подавляется ингибиторами метаболизма: убаином, блокирующим K^+ , Na^+ АТФазу, и аминазином и метилциклодекстрином – блокаторами сборки клатриновых и кавеолиновых «корзинок». В то же время, амилорид (ингибитор пиноцитоза) не оказывал влияния на захват ЛПНП эндотелиальными клетками (Рисунок 9). Таким образом, транспорт ЛПНП происходит путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием клатринового и кавеолинового механизмов.

Это подтверждается также и результатами, полученными с помощью конфокальной микроскопии, о колокализации кавеолина, меченного холерного токсина (который захватывается клетками при участии кавеолина) и ЛПНП в эндотелиальных клетках, инкубированных с этими веществами (Рисунок 10).

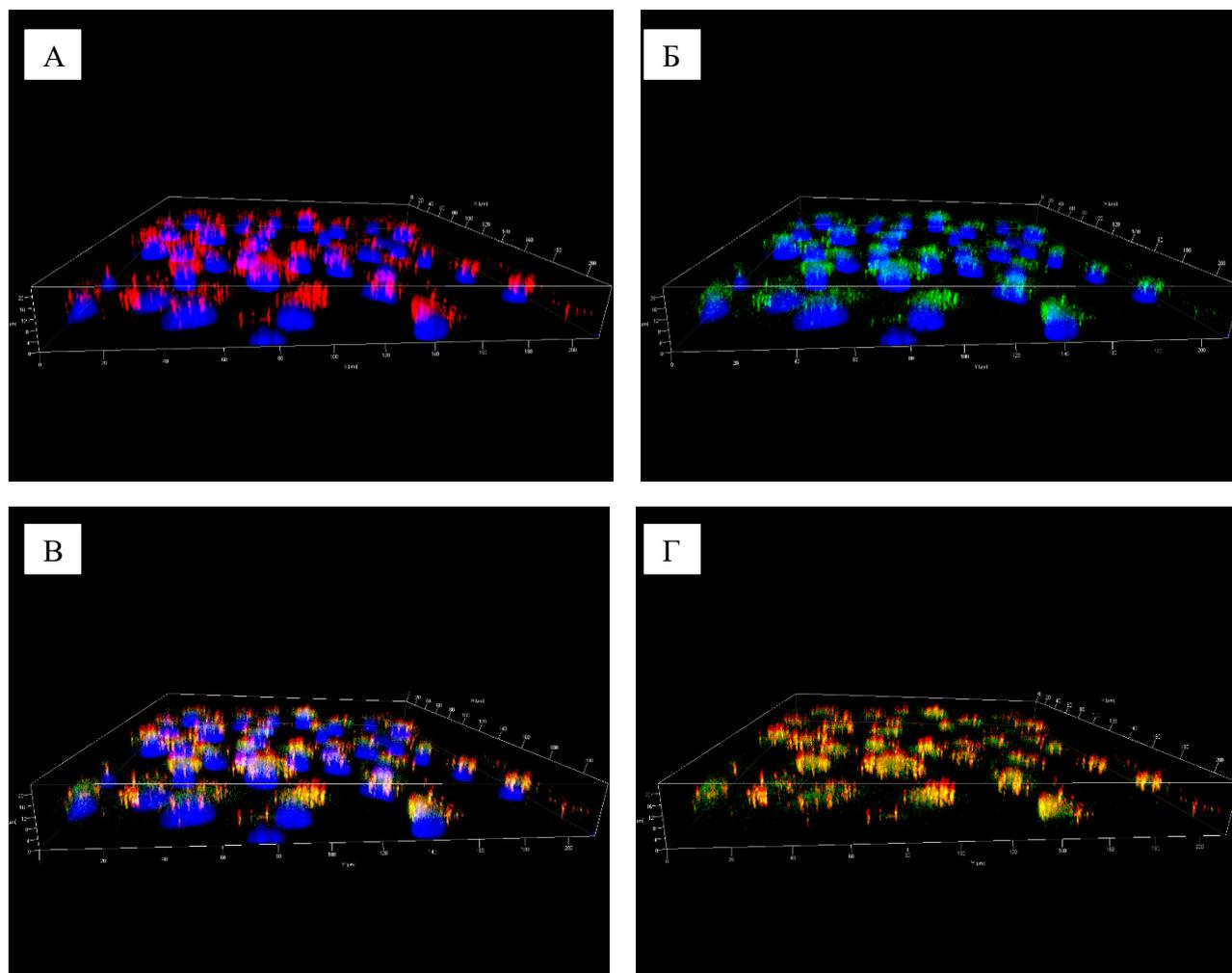


Рисунок 10. Конфокальная микроскопия (ув. $\times 20$). Изучение колокализации меченых ЛПНП с кавеוליном в эндотелиальных клетках EA.hy926. 3D изображение эндотелиального монослоя (синий цвет – меченые DAPI ядра): а) ЛПНП меченые ROX (красный цвет), б) кавеолин (холерный токсин, меченый красителем FITC) (зелёный цвет), в) наложение двух меток ЛПНП и кавеолин соответственно, г) наложение двух меток ЛПНП и кавеолин соответственно, без детекции ядер.

Влияние факторов воспаления на трансэндотелиальный транспорт. Одним из основных патогенетических событий при атеросклерозе является развитие воспаления в ответ на накопление и модификацию ЛПНП. Накопление

атерогенных липопротеинов в интиме является результатом очагового увеличения их поступления через эндотелий. При этом остается неясным, как развивающееся в интиме воспаление может влиять на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП. Кроме того, известно, что системное воспаление утяжеляет развитие атеросклероза и способствует развитию сосудистых катастроф.

Мы исследовали влияние факторов воспаления на прохождение плазменных белков, в частности ЛПНП, через эндотелиальный монослой *in vitro*. Кроме того, в некоторых экспериментах в качестве источника различных факторов воспаления выступали тучные клетки (активированные и интактные).

В связи с тем, что некоторые факторы воспаления могут обладать цитотоксичностью, прежде всего, мы проверили, не происходит ли повреждения монослоя эндотелиальных клеток изучаемыми агентами, что, естественно, может повлиять на проницаемость монослоя. Однако оценка гибели клеток под действием всех изучаемых веществ не выявила повышения количества погибших клеток, по сравнению с инкубацией без этих веществ, и не превышала 5-7%. В качестве положительного контроля был использован камптотecin (СAМ 10 мкМ; Sigma-Aldrich, США), цитотоксический хинолиновый алкалоид, ингибирующий топоизомеразу I, ядерный фермент, участвующий в процессе репликации ДНК. Камптотecin в наших экспериментах после 24 часов инкубации индуцировал гибель более 20% эндотелиальных клеток. Таким образом, изменение скорости трансэндотелиального транспорта белковых молекул, в частности ЛПНП, в присутствии использованных нами веществ не является результатом гибели клеток и нарушения целостности эндотелиального монослоя.

Влияние С-реактивного белка (СRР) на трансэндотелиальный транспорт белков и липопротеинов плазмы крови человека. Известно, что содержание в крови С-реактивного белка (системного фактора воспаления) увеличивается на порядок при воспалительных реакциях.

В наших экспериментах эндотелиальный монослой инкубировали с СRР в разных концентрациях, наибольший эффект СRР мы наблюдали в концентрации 200 мкг/мл (которая не является токсичной для клеток, как было показано ранее). Выяснилось, что СRР увеличивает проницаемость эндотелиального монослоя для всех тестируемых веществ, причем максимальный эффект наблюдался при 24-часовой инкубации, хотя трансэндотелиальный транспорт липопротеинов увеличивался уже после 12 часов инкубации (Рисунок 11).

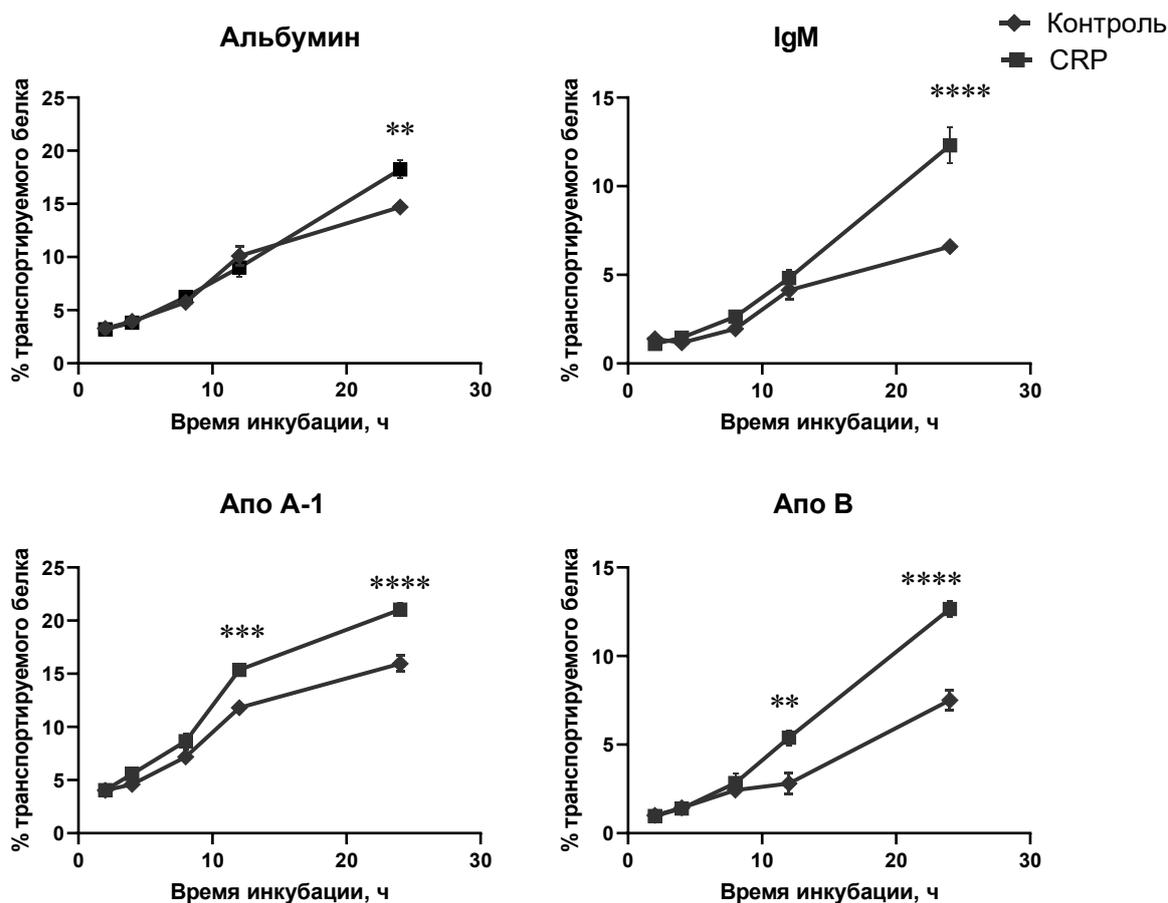


Рисунок 11. Влияние С-реактивного белка (CRP) на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 20-25$). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$. Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Шидака.

Влияние фактора некроза опухолей альфа ($TNF\alpha$) на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП плазмы крови человека. $TNF\alpha$ в концентрации 50 нг/мл к 24 ч инкубации также существенно ускорял трансэндотелиальный транспорт ЛПНП (Рисунок 12). При использовании ингибиторов сигнальных путей было установлено, что только ингибитор JNK подавлял действие $TNF\alpha$ на проницаемость ЛПНП через монослой эндотелиальных клеток, тогда как ингибиторы $Nf-kB$, киназ $p38$, МЭК1/2 не отменяли эффект $TNF\alpha$ (Рисунок 13). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что $TNF\alpha$ воздействует на трансэндотелиальный транспорт через JNK-протеинкиназный сигнальный путь.

Активация трансэндотелиального транспорта ЛПНП под действием наиболее распространенных факторов воспаления может являться одним из возможных механизмов проатерогенного действия таких состояний как ожирение, для которого характерно длительное повышение содержания в крови как $TNF\alpha$, так и CRP [Kleemann et al, 2008].

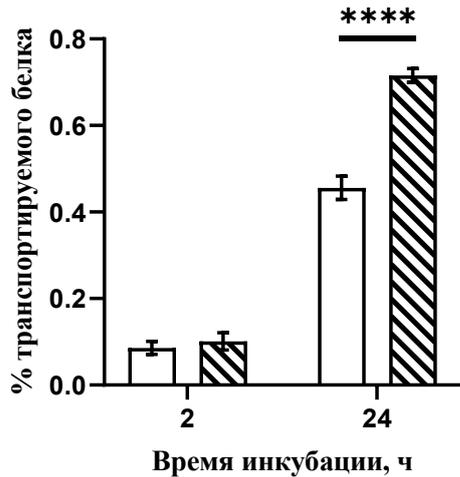


Рисунок 12. Влияние TNFα в концентрации 50 нг/мл на транспорт ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного в верхнюю камеру ЛПНП). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние ± SD (n = 20-25). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Шидака. ****- p < 0,0001

□ Контроль (DMEM) ▨ TNFα (50нг/мл)

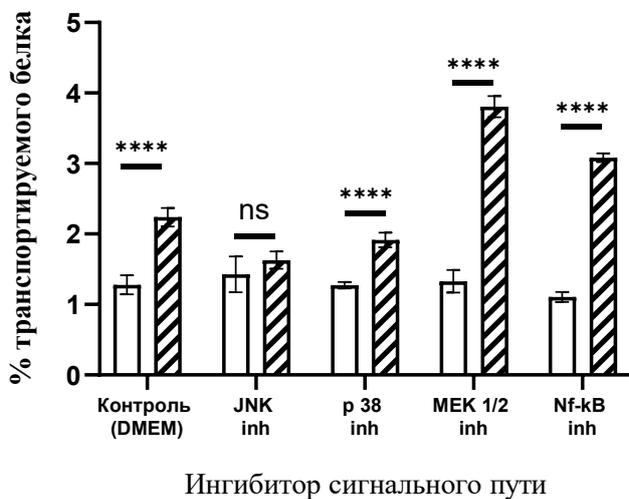


Рисунок 13. Влияние ингибиторов сигнального пути на активацию TNFα транспорта ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного в верхнюю камеру ЛПНП). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние ± SD (n = 20-25). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Шидака. ****- p < 0,0001

□ Контроль (DMEM) ▨ TNFα (50нг/мл)

Влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт белков. Увеличение сосудистой проницаемости является отличительной чертой воспалительного процесса. Известно, что гистамин повышает проницаемость венул вызывая образование зазоров между эндотелиальными клетками. Данный процесс протекает быстро, эффект можно наблюдать уже с первых минут инкубации [Yong et al, 2015].

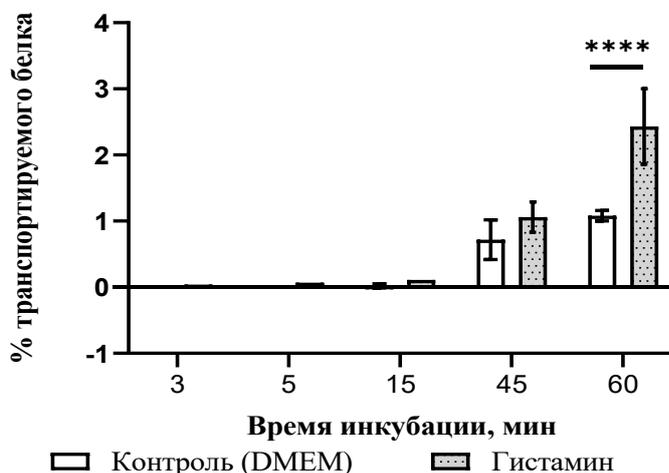


Рисунок 14. Влияние гистамина на транспорт ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного в верхнюю камеру ЛПНП). Инкубация в течение 60 мин. Приведены средние ± SD (n = 15-20). Двухфакторный дисперсионный анализ в зависимости от времени инкубации, апостериорный критерий Шидака. ****- p < 0,0001

□ Контроль (DMEM) ▨ Гистамин

Мы наблюдали увеличение проницаемости эндотелиального монослоя для ЛПНП к концу 1 часа наблюдения (Рисунок 14). Так как эффект гистамина на более ранних временных промежутках довольно сложно обнаружить методом иммуноферментного анализа мы прибегли к ещё одному методу оценки проницаемости эндотелия. Это высокочувствительный метод измерения клеточного импеданса с помощью прибора "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США). Эксперименты проводились на базе ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова" Минздрава России.

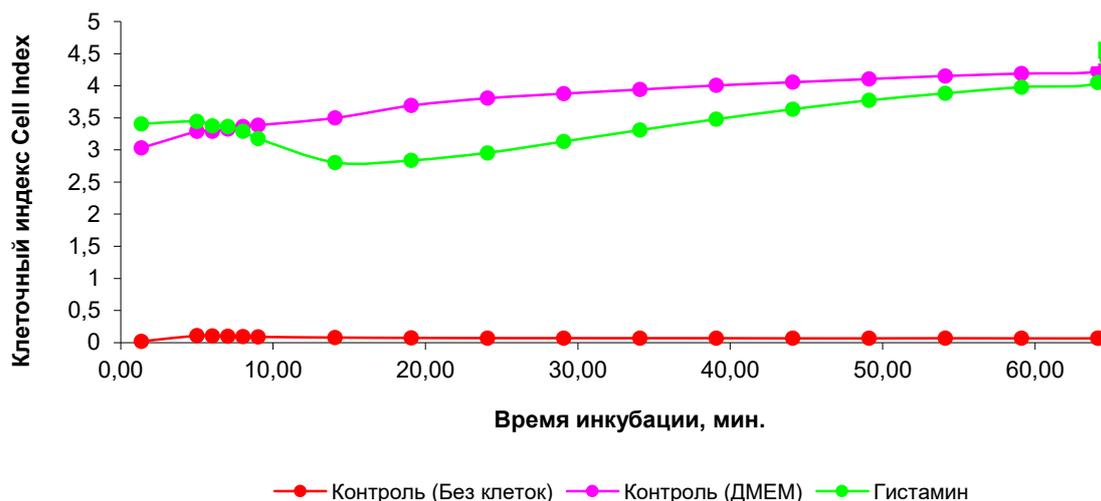


Рисунок 15. Влияние гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя при измерении клеточного биоимпеданса. Инкубация в течение 60 мин. Данные представлены в виде графика с использованием программного обеспечения прибора: "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США).

Суть метода заключается в измерении электрического сопротивления клеточного монослоя. При увеличении межклеточных промежутков сопротивление клеточного монослоя уменьшается. Результаты эксперимента отражены на рисунке 15, где представлен график зависимости клеточного сопротивления от времени инкубации.

Кривая импеданса показывает, что гистамин повышает проницаемость эндотелия через 3-5 минут после добавления, максимальный эффект повышения проницаемости наблюдается через 13-15 мин, затем проницаемость эндотелия снижается, о чем свидетельствует возрастание сопротивления клеточного монослоя, выходит на плато достигая контрольных значений к 50 мин. эксперимента.

На более поздних сроках инкубации гистамин вызывал понижение эндотелиальной проницаемости для всех изучаемых белковых молекул и липопротеинов (альбумин, IgM, апо А-1, апо В) примерно в одинаковой степени. Таким образом, действие гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя имеет двухфазный характер. Первая фаза – в интервале примерно 3-60 мин – характеризуется повышением проницаемости монослоя, по-видимому, за счет увеличения межклеточных промежутков. Вторая фаза – 1-24 часа – характеризуется уменьшением трансэндотелиального транспорта белковых молекул и липопротеинов (Рисунок 16).

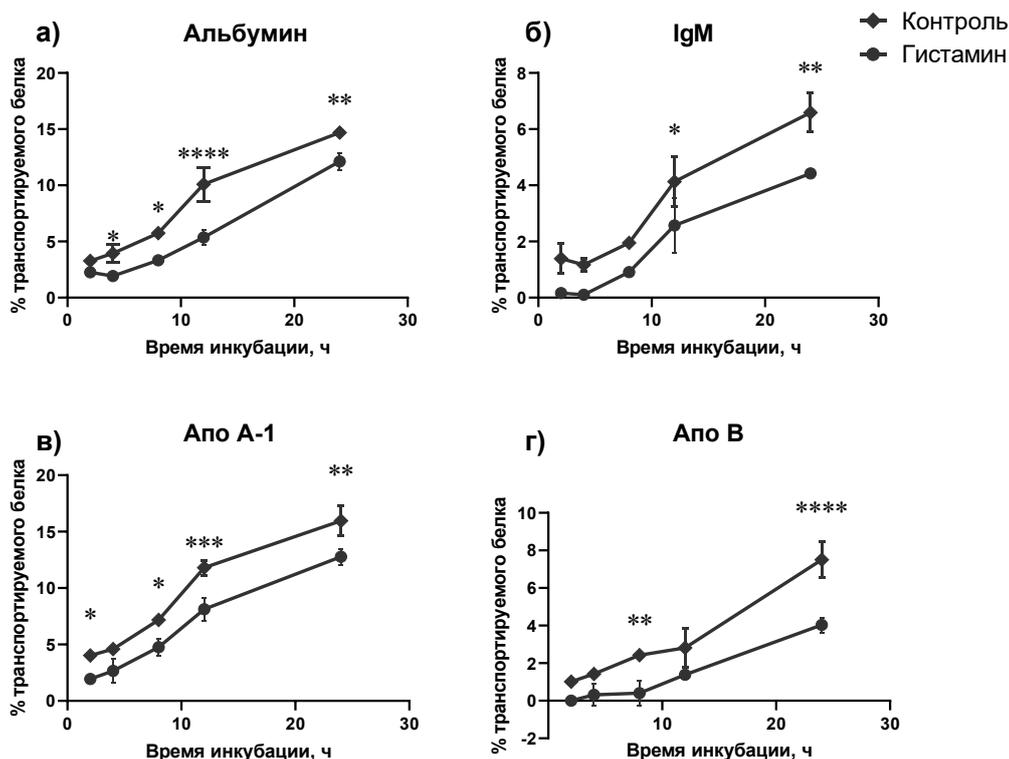


Рисунок 16. Влияние гистамина на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 20-25). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$. Двухфакторный дисперсионный анализ различия по сравнению с контролем, апостериорный критерий Шидака.

а) Альбумин; б) IgM; в) Апо А-1; г) Апо В

Идентификация рецепторов, опосредующих влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт веществ. Известно, что существуют два типа гистаминовых рецепторов – H1 и H2. Используя селективные ингибиторы одного из этих рецепторов (супрастин - ингибитор H1 и квамател - ингибитор H2), мы решили выяснить через какой из рецепторов реализуется действие гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя. Оказалось, что ингибирующий эффект гистамина на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП полностью отменялся супрастином (ингибитором H1), тогда как квамател (ингибитор H2) не влиял на выраженность подавления такого транспорта гистамином (Рисунок 17).

Эти данные свидетельствуют о том, что гистамин действует на эндотелиальные клетки человека линии EA.hy926 через H1 рецепторы.

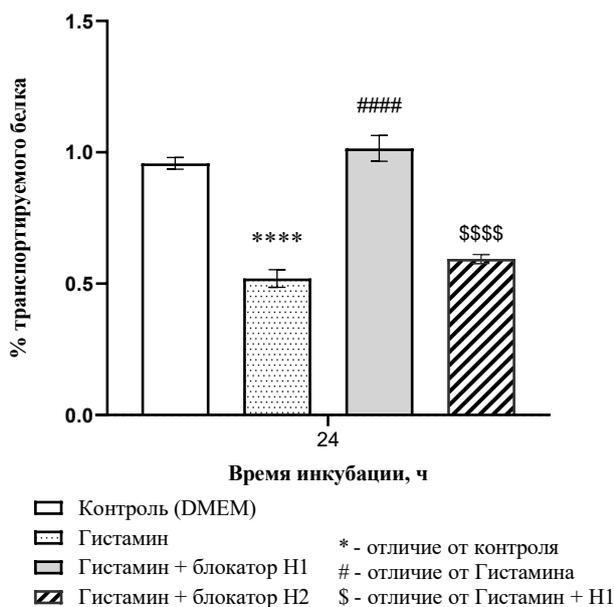


Рисунок 17. Влияние гистамина и ингибиторов H1 и H2 рецепторов на транспорт ЛПНП через эндотелиальный монослой (указан % от добавленного в верхнюю камеру). Супрастин и квамател использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно. Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 20-25). Однофакторный дисперсионный анализ, различия между группами апостериорный критерий Тьюки. ****, ####, \$\$\$\$ – p < 0,0001.

Влияние тучных клеток человека линии НМС-1 на трансэндотелиальный транспорт веществ. Для оценки влияния ТК на трансэндотелиальный транспорт белковых в нижнюю камеру двухкамерной системы были помещены ТК. ТК человека линии НМС-1 (количество ТК соответствовало концентрации гистамина 10^{-6} М, измеренной с помощью метода Шора в супернатантах активированных клеток) помещались в нижнюю камеру или предварительно активированные различными факторами или клетки без активации.

Не активированные ТК значительно уменьшали проницаемость эндотелиального монослоя для ЛПНП к 24 часам инкубации по сравнению с контролем. Для понимания механизма воздействия ТК в инкубационную среду были добавлены ингибиторы гистаминовых рецепторов. Выяснилось, что блокатор гистаминового рецептора H1 (супрастин) частично отменяет действие ТК на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП, тогда как блокатор H2 (кватател) не оказывал существенного влияния на этот процесс (Рисунок 18).



Рисунок 18. Влияние находящихся в нижней камере интактных ТК человека НМС-1 на транспорт белка через эндотелиальный монослой (указан % от добавленного в верхнюю камеру) и его зависимость от гистаминовых рецепторов H1 и H2. Супрастин и кватател использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно. Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 20-25). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки. ****, ####, \$\$\$\$ – p < 0,0001

ТК, активированные агрегированным IgG (300 мкг/мл), также уменьшали проницаемость эндотелиального монослоя для ЛПНП, причем примерно в такой же степени, как и не активированные ТК. При этом блокатор рецепторов H1 частично отменял действие ТК (Рисунок 19). При активации ТК веществом 48/80 (20 мкг/мл) были получены сходные результаты.

Эти результаты позволяют заключить, что ТК подавляют проницаемость эндотелиального монослоя лишь частично за счет продукции гистамина, т.к. блокада гистаминовых рецепторов не полностью отменяла эффект ТК, как это наблюдалось при действии гистамина (Рисунок 17).

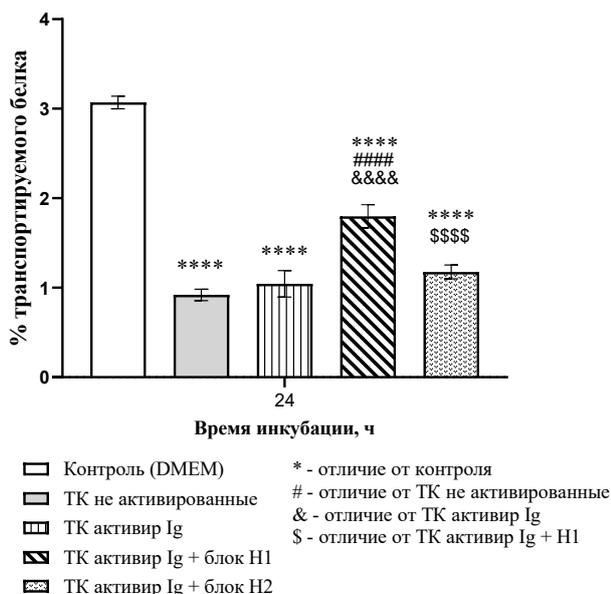


Рисунок 19. Влияние находящихся в нижней камере ТК человека линии НМС-1, активированных агрегированным IgG человека (aIgG) на транспорт белка через эндотелиальный монослой (указан % от добавленного в верхнюю камеру) и его зависимость от гистаминовых рецепторов H1 и H2.

Супрастин и квамател использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно.

Инкубация в течение 24 ч.

Приведены средние \pm SD (n = 20-25).

Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки.

****, ####, \$\$\$\$ – p < 0,0001

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование показало, что двухкамерная система культивирования монослоя эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 является подходящей моделью для изучения механизмов трансэндотелиального транспорта белков и ЛПНП, а также влияния факторов воспаления на этот процесс. На данной модели были получены воспроизводимые результаты, сходные с уже известными данными с использованием культур первичных эндотелиальных клеток.

Эти результаты, полученные различными методами, свидетельствуют о том, что после формирования плотного монослоя транспорт исследованных белков и липопротеинов осуществляется, главным образом трансцеллюлярно, а не через межклеточные контакты. С помощью различных ингибиторов клатрин-зависимого (аминазин, метилциклодекстрин) и кавеолин-зависимого (уабаин) транспорта было установлено, что в транспорте изучаемых нами веществ (альбумин, IgM, ЛПВП и ЛПНП) через монослой эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 принимают участие оба типа транспортных систем. В дополнении к сказанному, доказательством, подтверждающим участие кавеолинового механизма транспорта, являются результаты о колокализации ЛПНП и кавеолина в эндотелиальных клетках, полученные с помощью конфокальной микроскопии.

С использованием указанной модели было продемонстрировано что факторы воспаления CRP и TNF α в концентрациях, соответствующих их уровню в крови при воспалительном процессе, стимулируют трансэндотелиальный транспорт белков и ЛПНП. Было установлено также, что TNF α осуществляет своё действие на транспорт через монослой эндотелиальных клеток через JNK киназный сигнальный

путь. ЛПС не оказывал влияния на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП в исследуемой клеточной модели. Возможно, что эффект ЛПС не был обнаружен в наших экспериментах вследствие того, что ЛПС способен связываться с ЛПНП, что предупреждает их связывание с эндотелиальными клетками. Кроме того, *in vivo* ЛПС может влиять на эндотелиальную проницаемость, индуцируя синтез и секрецию вазоактивных веществ другими типами клеток, прежде всего макрофагами.

В настоящем исследовании впервые было доказано, что гистамин имеет двухфазный характер действия. Эффект гистамина имеет две фазы: раннюю, продолжительностью около часа, в течение которой транспорт ЛПНП усиливается, и вторую, отсроченную, длившуюся до конца первых суток, когда трансэндотелиальный транспорт ЛПНП существенно снижался. Таким образом, эндотелий отвечает на гистамин быстрым, но кратковременным повышением проницаемости для компонентов крови, вслед за чем наступает более продолжительная фаза «закрытия» эндотелия.

Для выяснения влияния ТК на трансэндотелиальный транспорт нами была разработана система кокультивирования эндотелиального монослоя с ТК. С помощью такого подхода впервые было установлено угнетающее влияние ТК на трансэндотелиальный транспорт белков и липопротеинов, причем главным действующим агентом тучных клеток на эндотелиальные клетки был гистамин. Роль гистамина подтверждена нейтрализацией (смягчением) его эффекта с помощью блокатора гистаминовых рецепторов H1. Судя по полученным данным, H2 рецепторы гистамина не участвуют в регуляции проницаемости эндотелия.

На основании полученных данных можно заключить, что ТК активно влияют на проницаемость эндотелия.

Таким образом использование двухкамерной системы культивирования монослоя эндотелиальных клеток человека позволяет проводить изучение механизмов трансэндотелиального транспорта различных веществ и его регуляции физиологическими и патологическими агентами. Получение новых сведений о закономерностях трансэндотелиального переноса белков и липопротеинов расширит наши представления о механизмах атерогенеза.

Кроме того, использованные нами модели предоставляют возможность проводить поиск и тестирование *in vitro* лекарственных препаратов, влияющих на проницаемость эндотелия.

ВЫВОДЫ

1. Разработана двухкамерная модель кокультивирования эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и тучных клеток человека линии НМС-1 позволяющая оценить влияние тучных клеток на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП, а также проводить скрининг различных веществ влияющих на антиатерогенез.
2. Кокультивирование тучных клеток с эндотелиальным монослоем приводит к подавлению трансэндотелиального транспорта ЛПНП, что обусловлено секрецией ими гистамина и взаимодействием данного медиатора с H1-рецепторами.
3. Выявлен двухфазный характер воздействия гистамина на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП: ранняя фаза продолжительностью около часа, в течение которой транспорт ЛПНП усиливается, и вторая, отсроченная, длившаяся до конца первых суток, при которой скорость транспорта ЛПНП, снижается ниже контрольной.
4. Провоспалительные факторы CRP и TNF α повышают скорость трансэндотелиального транспорта ЛПНП, причем TNF α реализует свое действие через JNK-киназный сигнальный путь.

5. Транспорт ЛПНП, а также альбумина, IgM и ЛПВП через монослой эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 осуществляется с участием клатринового и кавеолинового механизмов трансцитоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Назаров П.Г. Влияние факторов воспаления на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов сыворотки крови *in vitro*. / Назаров П.Г., **Мальцева О.Н.**, Таянский Д.А., Денисенко А.Д. // Цитокины и воспаление – 2015. – Т. 14 – № 4 – С. 59– 64.
2. **Мальцева О.Н.** Двухфазный характер действия гистамина на проницаемость монослоя эндотелиальных клеток линии EA.hy926 для белковых молекул *in vitro*. / **Мальцева О.Н.**, Назаров П.Г., Таянский Д.А., Денисенко А.Д. // Цитокины и воспаление – 2019. – Т. 18 – №1–4 – С. 91– 96.
3. Nazarov P.G. Mast Cells and Control of Transendothelial Transport: the Role of Histamine. / Nazarov P.G., **Maltseva O.N.**, Tanyanskiy D.A. *et al.* // *Cell Tiss. Biol. Scopus*. – 2021. – Т. 15 – С. 402–408.

Материалы конференций:

1. Nazarov P.G. Mast cell: a provocative element in inflammation - associated atherogenesis and autoimmunity. / Nazarov P.G., **Maltseva O.N.**, Shishkin V.I. // 9th International Congress on Autoimmunity, Nice, March 26-30, 2014.
2. **Maltseva O.N.** Mast cell: a provocative element in inflammation-associated atherogenesis and autoimmunity. / **Maltseva O.N.**, Nazarov P.G., Shishkin V.I. // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино, 21 – 25 апреля 2014.
3. Бородина Д.В. Изучение транспорта белков плазмы крови через монослой эндотелиоцитов человека. / Бородина Д.В., **Мальцева О.Н.** // 7-я Конференция молодых учёных по клинической биохимии: инновационные решения современных проблем. Клиническая биохимия. Первый Санкт-Петербургский госуд. мед. университет им. акад. И.П. Павлова. - 2015.
4. **Мальцева О.Н.** Изучение транспорта белков плазмы крови человека через монослой эндотелиоцитов линии EA.HY926. / **Мальцева О.Н.** и др. // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 19-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино, 20 - 24 апреля 2015. – С. 346.
5. **Мальцева О.Н.** Клеточная модель трансэндотелиального транспорта молекул сыворотки крови для исследования механизмов атерогенеза. / **Мальцева О.Н.** и др. // Дни иммунологии в Сибири: Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Новосибирск, Красноярск, 27-29 августа 2015 – С. 16–17.
6. Таянский Д.А. Изучение механизма транспорта белков плазмы крови человека через эндотелиоциты линии EA.hy926. / Таянский Д.А., **Мальцева О.Н.**, Агеева Е.В., Назаров П.Г., Денисенко А.Д. // Всероссийская научно-практическая конференция "Лабораторная диагностика в решении проблем современной клинической медицины", посвященная 125-летию кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики и 95-летию академика А.Н.Климова. Санкт-Петербург, 8-9 декабря 2015 – С. 74.

7. **Мальцева О.Н.** Клеточная модель трансэндотелиального транспорта молекул сыворотки крови с использованием эндотелиоцитов линии EA.hy926. / **Мальцева О.Н.**, Таянский Д.А. // Биология – наука XXI века: 20-я Международная Пушинская школа- конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино, 18 - 22 апреля 2016.
8. **Maltseva Olga** Cellular model for studying the atherogenic mechanism. / **Olga Maltseva**, Tanyanskii D., Nazarov P., Denisenko A. // 22nd ANNUAL SCANDINAVIAN ATHEROSCLEROSIS CONFERENCE, April 13th-16th, 2016 Humlebæk, Denmark.
9. **Мальцева О.Н.** Трансэндотелиальный транспорт липопротеинов сыворотки крови под влиянием факторов воспаления *in vitro*. / **Мальцева О.Н.** // Биология – наука XXI века: 21-я Международная Пушинская школа - конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино, 17 - 21 апреля 2017.
10. Ageeva E.V. The study of influence of inflammatory mediators on EA.Hy926 monolayers permeability for lipoproteins. / Ageeva E.V., Tanyanskiy D.A., **Maltseva O.N.**, Borodina D.V., Larionova E.E., Matweeva S.S., Nazarov P.G., Denisenko A.D. // Metabolic Syndrome, type II Diabetes and Atherosclerosis Congress, June 8-10, Saint Petersburg.
11. **Мальцева О.Н.** Участие тучных клеток в регуляции трансэндотелиального транспорта молекул сыворотки крови на модели *in vitro* с участием эндотелиальных клеток линии EA.hy926. / **Мальцева О.Н.** // Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино, 23 - 27 апреля 2018.
12. Таянский Д.А. Адипонектин в атеросклеротической бляшке: друг или враг? / Таянский Д.А., Пигаревский П.В., Мальцева С.В., Малашичева А.Б., Докшин П.М., **Мальцева О.Н.**, Салль Т.С., Трулев А.С., Никитин А.А., Некрасова Е.В., Денисенко А.Д. // Ежегодная Всероссийская научно-практическая конференция «КАРДИОЛОГИЯ НА МАРШЕ 2021» и 61-я сессия ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 7-9 сентября 2021г, Москва.
13. **Мальцева О.Н.** Клеточная модель сокультивирования эндотелиальных и тучных клеток для исследования механизмов атерогенеза. / **Мальцева О.Н.**, Таянский Д.А. // VII съезд биохимиков России, 3-7 октября 2021, Сочи.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CRP — С-реактивный белок
 JNK – N-концевые киназы c-Jun
 TNF α — фактор некроза опухоли α
 Апо А-1 — аполипопротеин А-1
 Апо В — аполипопротеин В
 АТФ — аденозинтрифосфат
 ИЛ — интерлейкин
 ЛПВП — липопротеины высокой плотности
 ЛПНП — липопротеины низкой плотности
 ЛПС — липополисахарид
 ТК — тучные клетки