

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

МАЛЬЦЕВА

Ольга Николаевна

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

1.5.22 – Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Денисенко Александр

Дорофеевич

Санкт-Петербург

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Эндотелий: структура, регуляция, функции	12
1.1.1. Наиболее важные функции эндотелия	15
1.1.2. Факторы воспаления.....	18
1.1.3. Факторы гемостаза.....	19
1.2. Роль эндотелия в патологических процессах	20
1.2.1. Атеросклероз	20
1.2.2. Инфекция и воспаление	21
1.3. Трансэндотелиальный транспорт: механизмы и регуляция.....	22
1.3.1. Факторы, оказывающие влияние на трансэндотелиальную проницаемость	34
1.4. Тучные клетки	41
1.4.1. Состав гранул тучных клеток	42
1.4.2. Терапевтический потенциал тучных клеток	44
1.4.3. Активаторы тучных клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях	49
1.4.4. Роль гистамина, выделяемого тучными клетками, в регуляции эндотелиальной проницаемости.....	51
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	54
2.1. Культивирование адгезионных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и суспензионных тучных клеток линии НМС-1.	54
2.1.1. Тучные клетки линии НМС-1	54
2.1.2. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926	55
2.2. Разработка модели культивирования клеток в двухкамерной системе с полупроницаемой мембраной.....	55
2.3. Микроскопическое исследование монослоя.....	58
2.4. Оценка конфлюентности эндотелиального монослоя при помощи FITC-декстрана (70кДа)	58
2.5. Оценка конфлюентности эндотелиального монослоя при помощи измерения клеточного биоимпеданса	58
2.6. Оценка экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках под действием TNF α методом проточной цитофлуориметрии	59
2.7. Активация тучных клеток.....	59

2.8. Определение концентрации выделенного тучными клетками гистамина, используя флуороскан методом Шора	60
2.9. Выделение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) из плазмы крови человека ультрацентрифугированием	61
2.10. Химическая конъюгация флуоресцентных меток с ЛПНП, альбумином и бета-субъединицей холерного токсина, транспорт которых через эндотелий является предметом изучения.....	61
2.11. Измерение концентрации ЛПНП по определению содержания белка с помощью ВСА реагента	61
2.12. Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения концентрации веществ (альбумина, IgM, CRP, АпоА-1, АпоВ, TNF α , ИЛ-8), прошедших через эндотелиальный монослой в нижнюю камеру системы	62
2.13. Проточная цитофлуориметрия для контроля апоптоза эндотелиальных клеток при воздействии факторов воспаления.	63
2.14. Подготовка эндотелиального монослоя к проведению конфокальной микроскопии для оценки захвата эндотелиальными клетками веществ.	63
2.15. Проточная цитофлуориметрия для определения влияния ингибиторов различных типов трансцитоза и TNF α на захват ЛПНП, меченых флуорохромом Су5, а также FITC-бета субъединицы холерного токсина эндотелиальными клетками EA.hy926.	64
2.16. Совместное культивирование клеток линий EA.hy926 и НМС-1 в двухкамерной системе.....	64
2.17. Статистическая обработка данных	65
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1. Проверка адекватности экспериментальной модели	67
3.1.1. Оценка конфлюэнтности эндотелиального монослоя	67
3.1.2. Идентификация VE-кадгерина.....	69
3.1.3. Транспорт различных белков плазмы через монослой эндотелия.	70
3.2. Исследование механизмов трансэндотелиального транспорта белка и липопротеинов плазмы крови.....	74
3.2.1. Влияние убаина на трансэндотелиальный транспорт	74
3.2.2. Влияние аминазина на трансэндотелиальный транспорт белков.....	75
3.2.3. Захват эндотелиоцитами линии EA.hy926 меченых макромолекул через 1 ч инкубации.	76
3.2.4. Использование метода проточной цитофлуориметрии для количественной оценки захвата меченых макромолекул эндотелиоцитами человека линии EA.hy926	81

3.2.5. Изучение колокализации меченых ЛПНП с кавеолином в клетках EA.hy926	83
3.3. Влияние основных факторов воспаления на трансэндотелиальный транспорт	85
3.3.1. Влияние фактора острой фазы воспаления С-реактивного белка (CRP) на трансэндотелиальный транспорт белков и липопротеинов плазмы крови человека	87
3.3.2. Влияние фактора некроза опухолей альфа (TNF α) на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП плазмы крови человека	89
3.3.3. Влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт белков	92
3.3.4. Влияние гистамина на транспорт веществ при блокаде H1 и H2 гистаминовых рецепторов эндотелия.	95
3.4. Трансэндотелиальный транспорт под влиянием находящихся в нижней камере интактных и активированных тучных клеток человека НМС-1	97
3.5. Влияние ЛПС на проницаемость эндотелиального монослоя.	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108

ВВЕДЕНИЕ

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 интимае 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 интимае 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.

Тучные клетки, встречающиеся практически во всех органах и тканях (кроме хрящевой и костной), располагаются обычно вблизи кровеносных и лимфатических сосудов [2]. Очаги скопления тучных клеток были обнаружены в интиме на поздних стадиях образования атеросклеротических поражений, в основном, неподалеку от бляшек и в областях их ранней кальцификации [3].

Цитоплазма зрелых тучных клеток более чем на 40 % заполнена гранулами. Основными компонентами гранул являются нейтральные протеазы (триптаза и/или химазы) и гепарин [4]. Кроме того, гранулы тучных клеток 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 [5]. Высвобождая содержимое гранул в ответ на различные экзогенные сигналы, тучные клетки способны воздействовать на соседние клетки и местное микроокружение.

Предполагается, что периваскулярные, а также интимальные тучные клетки вносят существенный вклад в патогенез атеросклероза и дестабилизацию бляшек [6]. Имеются сведения, что увеличение количества ТК в адвентиции коронарных артерий связано с развитием вазоспазмов [7]. Предполагается, что это объясняется способностью секретируемых тучными клетками гистамина, простагландина D₂ и лейкотриенов влиять на функцию эндотелиальных клеток и вазореактивность.

Гистамин хорошо известен как регулятор вазодилатации и функции эндотелиальной клетки [8]. Отмечено увеличение уровней гистамина в коронарных артериях пациентов с ишемической болезнью сердца и повышенными уровнями гистамина в циркуляции у пациентов с вариантной стенокардией [9, 10].

Гистамин повышает проницаемость венул, вызывая увеличение

промежутков между эндотелиальными клетками. Повышение проницаемости носит временный характер и длится всего несколько минут при непрерывном действии гистамина [11]. Свои эффекты гистамин реализует через семейство из четырёх различных рецепторов, связанных с G-белками, – H_1R , H_2R , H_3R и H_4R [8]. На сосудистом эндотелии экспрессируется H_1 -рецептор, он ответственен за сосудистые эффекты гистамина [12].

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 вены 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 [11, 13]. Время полураспада гистамина составляет примерно 1 мин [13]. Эта особенность действия гистамина важна для сохранения белков плазмы внутри сосудов. Гистаминовый рецептор H_1 наиболее широко представлен на эндотелиальных клетках вен и именно он опосредует большинство острых сосудистых эффектов гистамина [14].

И хотя гистамин является в первую очередь медиатором аллергического воспаления, однако и гистамин, и его рецепторы обнаруживаются на клетках в атеросклеротических поражениях [15]. Было показано, что гистамин вызывает изменения формы культивируемых эндотелиальных клеток, усиливает мобильность и ускоряет рост клеток и продукцию простаглицина [16].

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 секретлируемых тучными клетками веществ на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов, в частности, наиболее атерогенных липопротеинов низкой плотности. 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 $\text{TNF}\alpha$ 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 ($\text{TNF}\alpha$ 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 долговременного торможения 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 интиме 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 трансцитоза.
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 издано 16 работ, в том числе 3 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 13 тезисов в материалах конференций.

Достоверность полученных результатов и аккуратность выводов обеспечены выбором адекватных, современных и широко применяемых в данной области исследования методов и корректной статистической обработкой полученных данных и подтверждены успешным представлением на тематических конференциях и публикациях 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, результаты и их обсуждение, заключение и выводы, а также список литературы из 242 наименования, среди которых 232 источника англоязычные и 10 русскоязычные.

Благодарности

Автор работы выражает признательность за идею данной работы, всестороннюю помощь в проведении исследования и глубоком анализе результатов Петру Григорьевичу Назарову, моему второму научному руководителю, который ушёл из жизни, но остаётся в памяти.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эндотелий: структура, регуляция, функции

Эндотелий играет важную роль в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы. Эндотелиальные клетки продуцируют множество васкулоактивных молекул, которые действуют местно и/или системно. Нарушение функции эндотелия является одним из первичных событий в патогенезе сосудистых заболеваний, например, таких как атеросклероз. По этим причинам изучение эндотелия человека является весьма актуальным. К сожалению, использование эндотелиальных клеток *in vitro* часто критикуют из-за неопределенной возможности аппроксимации полученных результатов на интактные органы и, что важно, на человека. Обнаружение эндотелиальных клеток-предшественников открыло возможность исследования регенерации сосудистого эндотелия. В то же время, было признано, что появление зрелых циркулирующих эндотелиальных клеток, в основном, является следствием повреждения сосудов.

В сочетании с минимально инвазивным способом получения живых эндотелиальных клеток человека с помощью эндоваскулярной биопсии новые методы позволяют по-новому взглянуть на эндотелиальные клетки человека [17]. Когда-то рассматривавшийся как пассивное внутреннее покрытие стенки сосуда, эндотелий на данный момент признан активным органом со многими важными функциями, такими как регуляция сосудистого тонуса и проницаемости, коагуляция, воспаление и ангиогенез. Следует отметить, что эндотелий имеет ограниченную способность к самовосстановлению. По перечисленным причинам оценка состояния эндотелия постепенно стала краеугольным камнем современных сердечно-сосудистых исследований, также на данный момент активно исследуются способы предотвращения или противодействия эндотелиальной дисфункции/повреждению [18].

Морфофункциональной единицей эндотелия являются эндотелиоциты – клетки полигональной плоской формы, обычно удлинённые по ходу сосуда и

связанные друг с другом плотными щелевыми соединениями. Эндотелиоциты имеют три поверхности: люминальную – контактирующую с кровью, базальную – контактирующую с базальной мембраной, и латеральную – участвующую в формировании контактов с соседними эндотелиоцитами. Каждая клетка имеет две зоны: выпуклую ядерную – она содержит удлиненное ядро и органеллы, и уплощенную периферическую – содержит различные транспортные структуры. Толщина эндотелиальной клетки составляет 1-2 мкм, а ее диаметр 10-20 мкм [19]. Эндотелиальные клетки выстилают все сосуды в один слой. В организме взрослого человека насчитывается 10^{12} – 10^{13} эндотелиоцитов, общая масса которых составляет около 1 кг, а площадь поверхности превышает 1000 м² [20]. Их цитоплазма истончена до 0,2–0,4 мкм и содержит большую популяцию транспортных пузырьков диаметром 60–70 нм, которые могут образовывать трансэндотелиальные каналы. Органеллы немногочисленны, локализуются вокруг ядра, для цитоскелета характерны виментиновые промежуточные филаменты. В эндотелиоцитах обнаруживаются особые палочковидные структуры длиной до 3 мкм (тельца Вейбеля – Паладе), содержащие фактор VIII свертывающей системы крови.

Эндотелиальные клетки и гематопоэтические клетки возникают из гемангиобластов, бластоподобных бипотенциальных клеток [21].

Важно отметить, что существуют заметные фенотипические различия между эндотелиальными клетками в разных частях сосудистой системы, так что клетки из разных мест у одного и того же человека не только экспрессируют разные поверхностные антигены и рецепторы, но могут генерировать разные ответы на один и тот же стимул [22]. Такие различия могут наблюдаться даже у эндотелиальных клеток из одной и той же части сосудистой сети. Также важно отметить, что реакция культивируемых эндотелиальных клеток на различные сигналы может существенно отличаться от реакции этих клеток *in vivo* [23].

Структура и функциональная целостность эндотелиальных клеток важны для поддержания функции кровообращения, сам по себе эндотелий не инертен. Он является полупроницаемым барьером и регулирует транспорт малых и больших

молекул в интиму. Помимо этого, эндотелиальные клетки выполняют как метаболические, так и регуляторные функции (Рис. 1). Продуцируемые ими биологически активные вещества оказывают важные аутокринные, паракринные и эндокринные воздействия на различные типы клеток (гладкомышечные клетки, тромбоциты и периферические лейкоциты) [20].



Рисунок 1. Эндотелиальные клетки выполняют ряд метаболических функций. Через секрецию большого количества медиаторов они могут влиять на клеточные функции по всему телу [20].

Здоровый эндотелий образует в сосудистой системе непрерывную выстилку, которая осуществляет прохождение питательных веществ и кислорода из крови в ткани, служит для удаления клеточных и метаболических отходов и регулирует

реактивность артерий посредством синтеза и высвобождения вазоактивных молекул [24].

Апикальная поверхность эндотелия покрыта слоем, называемым эндотелиальным гликокаликсом [25], который представляет собой мозаику гликопротеинов, протеогликанов, цепей гликозаминогликанов, а также адсорбированных белков плазмы, включая альбумин [26].

Эндотелиальные клетки из различных отделов сосудистой системы организма имеют некоторые различия в их морфологии и функциональной активности [27, 28]. Аналогичным образом, соответствующий эндотелиальный гликокаликс также различается в разных сосудах [29]. Эта фенотипическая гетерогенность позволяет эндотелию выполнять множество функций, адаптированных для разных участков сосудистого русла.

1.1.1. Наиболее важные функции эндотелия

Транспортная функция

Эндотелий является важным барьером для свободного прохождения молекул и клеток из крови в нижележащий интерстиций и клетки. Специфические транспортные механизмы переносят важные макромолекулы циркулирующей крови через эндотелиальные клетки в субэндотелиальное пространство для удовлетворения метаболических потребностей клеток сосудистой стенки и окружающих тканей [30]. Подробнее механизмы транспорта будут описаны в разделе 1.3.

Регуляторная функция (Секреция биологически активных веществ)

Вазоактивные вещества.

Эндотелий выделяет различные вазоактивные факторы в ответ на гуморальные и механические стимулы, которые могут влиять на функцию подлежащих гладких мышц сосудов. Это могут быть вазодилатирующие факторы, такие как оксид азота (NO), простаглицлин и гиперполяризующий фактор эндотелия

(EDHF), или сосудосуживающие факторы, такие как тромбоксан и эндотелин-1 (ET-1) [20, 31, 32].

а) Оксид азота

NO является эндотелиальным вазодилататором, вызывающим расслабление подлежащих гладкомышечных клеток меди. Впервые был идентифицирован Furchgott и Zawadzki [33]. Было показано, что NO играет важную роль в поддержании базального вазодилататорного состояния кровеносных сосудов [34, 35]. NO образуется под действием фермента синтазы оксида азота, который использует в качестве субстрата аминокислоту L-аргинин [36]. Существуют три изоформы синтазы оксида азота, одна из них эндотелиальная синтаза оксида азота, которая продуцирует NO в сосудистой сети [37].

Неактивная эндотелиальная синтаза оксида азота связана с белком кавеолином и располагается в небольших впячиваниях в клеточной мембране, называемых кавеолами. Когда внутриклеточный уровень Ca^{2+} увеличивается, эндотелиальная синтаза оксида азота отделяется от кавеолина и активируется [38]. Таким образом активность эндотелиальной синтазы оксида азота повышают брадикинин, ацетилхолин, аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат, вещество P и тромбин. Все эти активаторы, связываясь со своими рецепторами на мембране эндотелиальных клеток, вызывают освобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума [39, 40].

б) Простациклин и тромбоксан A_2

Синергетическое действие двух простаноидов - простациклина и тромбоксана A_2 - также регулирует функцию сосудов, помимо их влияния на тромбоциты [41]. Их образование катализируется ферментом циклооксигеназой, у которой выделяют изоформы: циклооксигеназа - 1 и циклооксигеназа - 2 [42]. Циклооксигеназа - 1 непрерывно экспрессируется эндотелиальные клетки, а циклооксигеназа - 2 экспрессируется только тогда, когда эндотелий поврежден и подвергается воздействию воспалительных цитокинов [43].

Простациклин синтезируется эндотелиальные клетки из арахидоновой кислоты в ответ на действие медиаторов воспаления, включая интерлейкин 1 (ИЛ-

1), тромбоцитарные и эпидермальные факторы роста. Подобно NO, простациклин является сильнодействующим вазодилататором, подавляет агрегацию тромбоцитов и тромбоз, и может действовать синергетически с NO в этом отношении [44].

в) Эндотелин-1

Эндотелин (ЭТ) является вазоконстриктором, представлен в организме в трёх изоформах: ЭТ-1, ЭТ-2 и ЭТ-3. Эндотелиальные клетки продуцируют только ЭТ-1. Однако рецепторы ЭТ распределяются по всему организму. ЭТ-1 оказывает заметное влияние на тонус сосудов вызывая сокращение гладкомышечных клеток за счёт стимуляции рецепторов эндотелина А-типа в гладких мышцах сосудов, что приводит к сужению сосуда. Кроме того, связываясь с рецепторами В-типа на эндотелиальных клетках ЭТ-1 активирует NO-синтазу, что приводит к увеличению продукции этого вазодилататора [45, 46].

ЭТ-1 стимулирует пролиферацию клеток и увеличивает экспрессию нескольких генов, включая коллагеназу, циклооксигеназу - 2 (простагландин-эндопероксидсинтазу) и тромбоцитарный фактор роста [20]. Продукция ЭТ-1, а также его высвобождение активируется провоспалительными агентами, такими как интерлейкины и фактор некроза опухоли альфа (TNF α), и снижается NO и простациклином [47].

г) Гиперполяризующий фактор эндотелия

Гиперполяризующий фактор эндотелия — ещё не идентифицированное сосудорасширяющее вещество (или механизм), которое гиперполяризует нижележащие гладкие мышцы, что приводит к их расслаблению и расширению сосуда [48, 49].

Таким образом, эндотелий высвобождает факторы, которые контролируют расширение и сужение сосудов, тромбообразование и фибринолиз, а также активацию и ингибирование тромбоцитов. Следовательно, поддержание функциональной целостности эндотелия имеет решающее значение для сохранения кровотока и предотвращения тромбозов [50].

1.1.2. Факторы воспаления.

Эндотелиальные клетки принимают участие в воспалительном процессе. Регулирование иммунных и воспалительных реакций зависит от связи между клетками с растворимыми молекулами, имеющими общий термин цитокины; к ним относятся хемокины, колониестимулирующие факторы, ИЛ, факторы роста и интерфероны (IFN). Это белки с низким молекулярным весом, которые регулируют как амплитуду, так и продолжительность иммунных и воспалительных реакций. Эндотелиальные клетки продуцируют множество цитокинов и других медиаторов и реагируют на них [20].

Хемокины

Репертуар хемокинов эндотелиальных клеток включает альфа- и бета-хемокины и фракталкин с эффектами на нейтрофилы, эозинофилы, Т-лимфоциты, естественные клетки-киллеры и моноциты [51].

Хотя спектр действия хемокинов обычно ограничивается воздействием на лейкоциты, некоторые исследования *in vitro* также показали их влияние на функцию эндотелиальных клеток. ИЛ-8 и некоторые другие α -хемокины стимулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и являются ангиогенными *in vivo*. Эндотелиальные клетки стратегически расположены на границе раздела «ткань – кровь» и предоставляют несколько хемокинов циркулирующим лейкоцитам. Когда хемокины продуцируются в больших количествах, например, при раке или хроническом воспалении, они вносят вклад в системное противовоспалительное действие, вызывая высвобождение так называемых рецепторов-ловушек для TNF α и ИЛ-1 в кровотоки [52].

Молекулы адгезии

Эндотелиальные клетки влияют на движение лейкоцитов в ткани посредством тщательно регулируемого процесса с участием молекул адгезии, которые опосредуют адгезию лейкоцитов к эндотелию, связываясь со специфическими лигандами на лейкоцитах [53].

Эндотелиальные клетки экспрессируют E-селектин, P-селектин, молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) и васкулярные молекулы клеточной адгезии

(VCAM). ICAM-2 конститутивно экспрессируется на покоящихся эндотелиальных клетках. ICAM-1 и VCAM только минимально экспрессируются на эндотелиальных клетках, но их экспрессия может быть увеличена за счёт активации цитокинами, и эндотоксином (ЛПС) [20].

Цитокины и факторы роста

Эндотелиальные клетки продуцируют различные цитокины и факторы роста в ответ на стимуляцию цитокинами, бактериальными продуктами, гипоксемией и другими медиаторами воспаления. К ним относятся гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, факторы стволовых клеток, а также ИЛ-1 и ИЛ-6 [54].

1.1.3. Факторы гемостаза.

Эндотелий обеспечивает нетромбогенность сосудистой стенки. Важным следствием дисфункции эндотелия является нарушение гемостатического баланса тромбогенных и фибринолитических факторов, что ведет к изменению жидкостности крови, патологическим геморрагиям и тромбообразованию. Эндотелиальные клетки синтезируют целый ряд антитромботических факторов: простациклин и NO, а также гепарино-подобные молекулы, тромбомодулин, экто-АТФазу, тканевой активатор плазминогена и урокиназу. Но эндотелий может также быть и тромбогенным, синтезируя тромбоксан A₂, вызывающий агрегацию тромбоцитов, адгезивные кофакторы для тромбоцитов (фактор фон Виллебранда, фибронектин и тромбоспондин) и прокоагулянтный фактор V. Более того, эндотелиальные клетки могут после активации различными патофизиологическими стимулами экспрессировать тканевой фактор, запускающий коагуляционный каскад. Кроме того, эндотелиальные клетки могут синтезировать ингибитор фибринолиза (РАI-1). Таким образом, в физиологических условиях нормальный эндотелий поддерживает жидкое состояние крови и предупреждает активацию циркулирующих клеток, тогда как повреждение эндотелия запускает серию биохимических и молекулярных реакций, способствующих остановке кровотока и восстановлению поврежденной

сосудистой стенки. [20, 55]. Основным регулятором роста эндотелия сосудов является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), продуцируемый множеством клеток, включая эндотелиальные клетки [56].

1.2. Роль эндотелия в патологических процессах

1.2.1. Атеросклероз

Атеросклероз – это системное воспалительное заболевание средних и крупных сосудов мышечно-эластического типа. Повреждения затрагивают все слои сосудистой стенки: интиму, медию и адвентицию. Этот процесс характеризуется развитием локального воспаления в ответ на накопление модифицированных липидов и липопротеинов, эндотелиальной дисфункцией, разрастанием и изменением фенотипа гладкомышечных клеток (с сократимого на секреторный), развитием фиброзной ткани с последующей кальцификацией, стенозом и окклюзией [57]. Воспалительный процесс при атеросклерозе можно наблюдать уже на ранних стадиях повреждения сосудистой стенки. В воспалительный процесс вовлечены различные типы иммунокомпетентных клеток, в первую очередь это моноциты, лимфоциты, тучные клетки.

Следует отметить, что инициирующим событием атерогенеза является задержка и накопление ЛПНП в интиме в результате очагового усиления трансэндотелиального транспорта липопротеинов. Удержание ЛПНП в стенке сосуда, может происходить в результате взаимодействия апо В с компонентами межклеточного матрикса, в частности с матриксными протеогликанами. Помимо ЛПНП, другие липопротеины, содержащие апо В, в том числе и липопротеины (а), могут также накапливаться в интиме и способствовать развитию атеросклероза [58].

В развитии атеросклероза артерий можно выделить несколько важных этапов. Первым из них, как упоминалось ранее, является избыточное накопление атерогенных липопротеинов низкой плотности в интиме. Затем следует процесс формирования ранних атеросклеротических поражений, таких как липидные пятна

и полоски. После чего наблюдается процесс трансформации ранних поражений в более развитые и значимые в клинической симптоматике, такие как бляшки и атеромы [59].

На данный момент времени существует множество гипотез, объясняющих патогенез атеросклероза, но единой теории нет и до сих пор до конца не выяснены механизмы увеличения трансэндотелиального транспорта липопротеинов.

Одним из ведущих факторов, влияющих на развитие атерогенеза, считается воздействие биомеханических сил на эндотелий, включая напряжение сдвига из-за нарушенного турбулентного кровотока, что активирует эндотелий, увеличивая вазомоторную дисфункцию и способствуя патологическому процессу за счёт активации проатерогенных генов. Напротив, нормальное ламинарное напряжение сдвига способствует экспрессии генов, которые могут защищать от атеросклероза.

1.2.2. Инфекция и воспаление

Воспаление способствует увеличению транспорта макромолекул за счёт уменьшения адгезии между клетками и клеточным матриксом, что приводит к образованию межклеточных промежутков. [60].

Инфицирование грамотрицательными микроорганизмами приводит к появлению в кровотоке эндотоксина или липополисахарида (ЛПС), который взаимодействует с ЛПС-связывающим белком и связывается с рецепторами CD14 и Toll-подобными рецепторами (TLR), активирующими транскрипционный фактор NF-κB. Активация NF-κB приводит к повышенной экспрессии нескольких провоспалительными генами, включая гены хемокинов, цитокинов, молекул адгезии, тканевого фактора, металлоферментом и синтазы оксида азота. Эндотелиальные клетки сами по себе не экспрессируют CD14, но могут быть активированы вследствие взаимодействия ЛПС с растворимыми CD14 и ЛПС-связывающим белком, присутствующими в кровотоке.

TLR представляют собой рецепторы молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами, для множества разнообразных молекул, происходящих из бактерий, вирусов и грибов. На сегодняшний день

идентифицировано 10 членов семейства TLR. TLR2 имеет решающее значение для распространения воспалительного ответа на компоненты грамположительных и грамотрицательных бактерий и микобактерий, такие как пептидогликан, липотейхоевая кислота, бактериальные липопротеины, липопептиды и липоарабиноманнан. TLR2 преимущественно экспрессируется в моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах, некоторая экспрессия также наблюдается в эндотелиальных клетках [61].

Эндотелиальные клетки экспрессируют преимущественно TLR4, который был также идентифицирован как рецептор для ЛПС. Таким образом TLR4 активируется ЛПС в эндотелиальных клетках сосудов. Было отмечено, что морфологические признаки повреждения эндотелиальных клеток у экспериментальных животных проявляются уже через 15 мин после инъекции ЛПС [62].

Эндотоксин и цитокины, включая $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$, повышают проницаемость эндотелиальных клеток за счёт воздействия на белки плотных контактов и увеличения экспрессии VEGF [63].

1.3. Трансэндотелиальный транспорт: механизмы и регуляция

Монослой эндотелиальных клеток, выстилающий внутренний слой сосудов, является барьером для проникновения жидкости и растворенных в ней веществ.

Эндотелиальный транспорт может осуществляться через параклеточные и трансцеллюлярные пути (рис. 2). Скорость прохождения транспортируемых макромолекул зависит от их молекулярных размеров, а также от барьерных свойств конкретного эндотелия [64]. Как указано на схеме, представленной на рис.2, растворенные вещества с молекулярным радиусом до 3 нм могут пассивно перемещаться через эндотелий параклеточным путем. Межклеточная проницаемость регулируется сложным взаимодействием клеточных адгезионных сил, уравновешенных противодействующими силами, генерируемыми молекулярными моторами актиномиозина. Трансклеточный везикулярный путь отвечает за активный транспорт макромолекул [65]. С увеличением M_r

глюкозу (<3 нм M_r - молекулярный радиус) транспортируются между эндотелиальными клетками (парацеллюлярно), т.е. через межэндотелиальные соединения [64].

Таким образом макромолекулы могут пересекать эндотелиальный барьер тремя способами: (1) между клетками, через межклеточные соединения (парацеллюлярно); (2) трансцеллюлярно - через поры в эндотелиальных клетках (слившиеся везикулы); и (3) трансцеллюлярно - через перемещающиеся везикулы с участием специфических рецепторов. Обычно считается, что заряд и плотность эндотелиального матрикса (как гликокаликса, так и базальной мембраны) дополнительно вносят вклад в селективность эндотелиального барьера по отношению к молекулам в зависимости от размера и заряда.

Данные электронной микроскопии убедительно свидетельствуют о том, что в тканевых капиллярах гормоны и макромолекулы перемещаются через эндотелиальный барьер через везикулы, в которых эти биомолекулы могут накапливаться из-за связывания с их рецепторами. С помощью таких механизмов можно обеспечить адекватное поступление гормонов и альбумина в различные ткани. Экстравазация жидкости и макромолекул напрямую связана с гидростатическим и осмотическим давлением [69].

Рассмотрим подробнее механизмы транспорта через эндотелий.

Плотные контакты

Плотные контакты (*Tight junctions*) — это межклеточные соединения, важные для параклеточного транспорта. Хотя проницаемость сосудов зависит как от параклеточного пути (плотные контакты), так и от трансцеллюлярного пути эндотелия, отёк развивается в основном в результате дисфункции плотных контактов. В организме человека эндотелиальные клетки некоторых органов могут иметь специфические особенности. Ярким примером является гематоэнцефалический барьер, состоящий из узкоспециализированных эндотелиальных клеток, плотные соединения которых защищают центральную нервную систему. Плотные соединения могут функционировать как «ворота» (проход для молекул) или «забор» (без прохода) [70].

Актин-миозиновое взаимодействие и образование эндотелиальной щели

Исследования эндотелиальных клеток показали, что у них есть сократительная система, которая требует наличия актина, немышечного миозина II, АТФ, ионов кальция и кальмодулина [71, 72]. Вероятно, эта система не изменяет длину всей клетки, а приводит к изменению лишь ее формы на небольших участках по периметру клетки. Это сокращение вызывает образование небольших промежутков на стыках клеток без полного разделения клеток. Эти промежутки, возникающие сразу после воздействия вазоактивных агентов, исчезают в течение нескольких минут [73].

Ряд экспериментов *in vitro* показывает, что регуляция функции эндотелиального барьера более сложная. В большинстве этих экспериментов тромбин использовался как стимул для увеличения проницаемости. В отличие от временного увеличения проницаемости, вызванного гистамином, тромбин вызывает длительное увеличение проницаемости [74].

Эти данные убедительно подтверждают, что увеличение актин-миозин-зависимого изометрического напряжения вносит вклад в длительное увеличение проницаемости эндотелия.

Обмены между кровью и окружающими тканями требуют жесткой регуляции эндотелиального барьера. На молекулярном уровне молекулы адгезии накапливаются на эндотелиальном стыке клетка-клетка и способствуют поддержанию целостности сосудов. Увеличение проницаемости эндотелия часто связано с нарушением регуляции соединительной адгезии [75]. VE-кадгерин, специфическая для эндотелия молекула адгезии между клетками, играет ключевую роль в формировании, созревании и ремоделировании сосудистой стенки, связан с внутриклеточными белками, такими как β -катенин, плакоглобин [76].

Адгезивные контакты между клетками лежат в основе многих морфогенетических процессов во время эмбрионального развития, а также контроля роста, обновления и регенерации постнатальных и взрослых тканей [77]. Формирование, поддержание и ремоделирование межклеточных контактов

достигается за счёт физического и функционального взаимодействия двух основных адгезивных структур: плотных контактов и спаек (рис. 3).

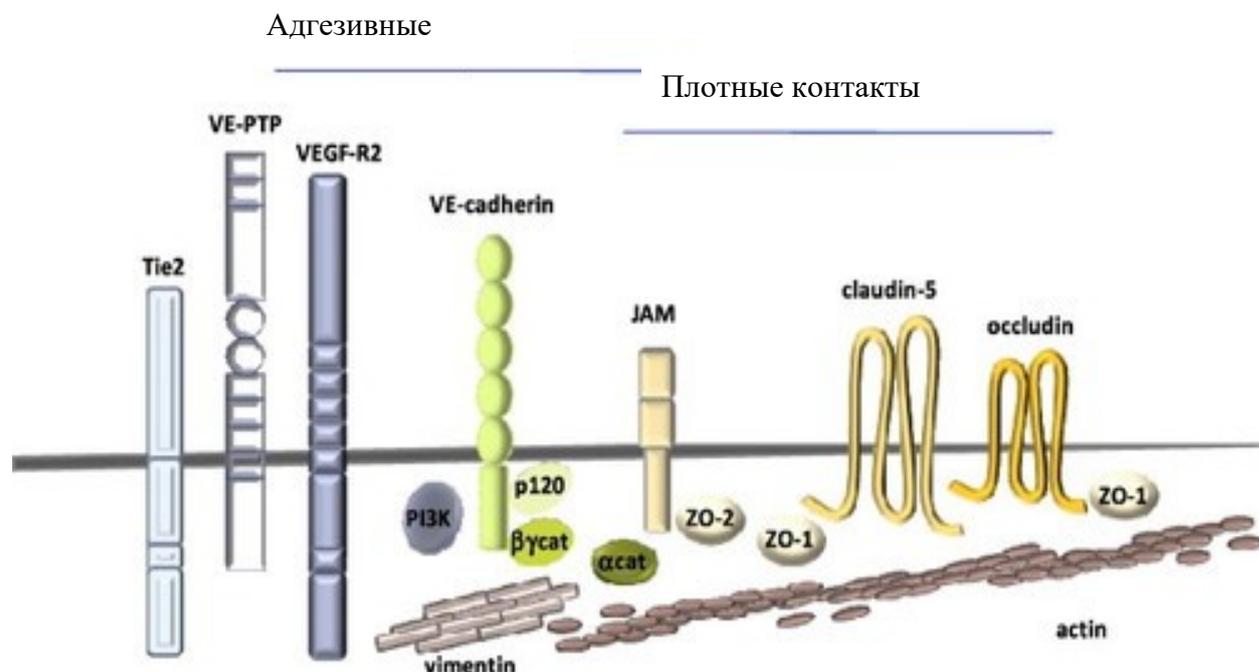


Рисунок 3. Эндотелиальные межклеточные соединения. Адгезивы и плотные контакты герметизировали эндотелиальные клетки через специфические молекулы межклеточной адгезии: VE-кадгерин, соединительные молекулы адгезии, клаудин-5, окклюдин. Эти адгезионные комплексы связаны с цитоскелетом актиновых филаментов и сетью промежуточных филаментов виментина через внутриклеточные медиаторы: p120, α , β и γ катенины (cat) и белки ZO. Соединения между клетками также могут концентрировать сигнальные компоненты, такие как фосфо-инозитид-3-киназа, рецептор фактора роста эндотелия сосудов типа 2 (VEGF-R2), специфическая для эндотелиальных клеток сосудов фосфотирозинфосфатаза и рецептор ангиопоэтина-1 [78].

Кадгерины, которые являются основным компонентом адгезивных соединений, принадлежат к консервативному семейству молекул межклеточной адгезии и связывают плазматическую мембрану с внутриклеточным актиновым цитоскелетом через белки семейства катенинов [78]. С помощью электронной микроскопии можно детектировать плотные соединения, которые образуют жёсткую ультраструктурную организацию, которая представляет собой многочисленные адгезивные молекулы, включая семейство клаудина и окклюдина тетра-spanовых трансмембранных белков, соединительные молекулы адгезии и

внутриклеточные адаптеры, а именно белки *zona occludens* (белки плотных контактов), — ZO-1 и ZO-2 [79]. Хотя плотные соединения часто располагаются апикально по отношению к соединениям адгезивов в эпителиальных клетках, оба соединения находятся во всех областях межклеточного контакта в эндотелиальных клетках [80, 81].

Барьерные свойства требуют адгезивной активности VE-кадгерин и клаудин-5, которые являются ключевыми компонентами адгезивов и плотных эндотелиальных контактов, соответственно (рис. 3). Действительно, поток макромолекул усиливается за счет клаудин-5 и VE-кадгерин-дефицитных эндотелиальных монослоев *in vitro* [82, 83]. В эндотелиальных клетках VE-кадгерин высоко экспрессируется и располагается на стыках соединений. Кроме того, высокие уровни N-кадгерина обнаруживаются в эндотелиальных клетках, но показывают слабую кластеризацию в эндотелиальных соединениях между клетками и занимают преимущественно апикальные части. Предполагается, что N-кадгерин, играет более важную роль в стабилизации сосудов за счёт гетеротипической адгезии между эндотелиальными клетками и перицитами [84]. VE-кадгерин необходим для предотвращения разрушения стенок кровеносных сосудов [85] и для координации прохождения макромолекул через эндотелий *in vitro* [82, 86]. Было показано, что VE-кадгерин напрямую увеличивает уровень экспрессии клаудина-5 [83]. Напротив, отсутствие функционального VE-кадгерина связано с потерей экспрессии клаудина -5, предполагая, что адгезия VE-кадгерина может действовать далее при формировании и поддержании целостности эндотелиального барьера. Следовательно, функция VE-кадгерина в эндотелиальных клетках тесно связана с целостностью сосудов и пластичностью эндотелиального барьера.

Растет число ангиогенных и воспалительных агентов, которые, как было показано, модулируют целостность сосудов *in vivo* и барьерные свойства эндотелиальных монослоев *in vitro*. Эти факторы, индуцирующие проницаемость, могут различаться по способу своего действия, и анализ их опосредованных сигнальных путей является предметом изучения многих исследователей (табл. 1).

Таблица 1. Факторы, индуцирующие проницаемость, их воздействие на VE-кадгерин

<u>Факторы, индуцирующие проницаемость</u>	<u>Воздействие на VE- кадгерин</u>
Факторы роста эндотелия сосудов VEGF	Фосфорилирование Интернализация Диссоциация катенина
Тромбин	Диссоциация катенина Фосфорилирование
Гистамин	Фосфорилирование Диссоциация катенина Интернализация
Фактор некроза опухоли TNF α	Фосфорилирование
ЛПС	Фосфорилирование
Активные формы кислорода	Фосфорилирование Диссоциация катенина

Скоординированное нарушение внутриклеточных взаимодействий VE-кадгерина за счёт фосфорилирования, интернализации и механических сил, скорее всего, коллективно способствует дестабилизации и разрушению адгезии VE-кадгерина, достигая высшей точки в реструктуризации как адгезивных, так и плотных контактов и последующего открытия эндотелиальных межклеточных соединений [87].

Трансцитоз

Трансцитоз – это трансэндотелиальный транспорт молекул через дискретные плазмалеммальные везикулы или кавеолы; является отличительной чертой эндотелиальных клеток [88]. Термин «трансцитоз» был введен Simionescu [89] для определения пути трансцеллюлярного транспорта, который связывает эндоцитоз с экзоцитозом на противоположных плазматических мембранах. В зависимости от задействованного механизма - жидкая фаза, адсорбция и опосредованные рецептором - плазмалеммальные везикулы забирают большую часть плазмы или молекул, которые были прикреплены к мембране везикул электростатически или опосредованно рецепторами, чтобы переносить их на аблюминальную поверхность эндотелия [90]. Трансцитоз включает инвагинацию плазматической мембраны на одной стороне клетки, образование везикулы, внутриклеточное движение везикулы через клетку с последующим слиянием мембраны везикулы с плазмалеммой на противоположной стороне эндотелиальной клетки и выброс везикулярного содержимого во внеклеточное пространство [91].

Морфометрический анализ распределения везикул внутри эндотелиальной клетки показал, что большая часть общей популяции везикул (~65 %) открыта для внеклеточной среды, с большим количеством кавеоларных профилей, открытых к аблюминальному фронту, тогда как оставшиеся 35 % были обнаружены как дискретные везикулярные носители внутри цитоплазмы. Электронная микроскопия показывает, что эндотелиальные везикулы имеют отчетливую поверхностную структуру, состоящую из чередующихся гребней и борозд, придающих характерный «полосатый» вид цитозольной части их мембраны [88].

Везикуло-вакуолярные органеллы

Везикуло-вакуолярные органеллы, представляют собой гроздевидные скопления взаимосвязанных непокрытых везикул и вакуолей, присутствующих в непрерывном эндотелии, выстилающем венулы, мелкие вены и сосуды опухоли [92]. Везикуло-вакуолярные органеллы - это огромные цитоплазматические структуры, диаметр которых может варьировать от 80 до 140 нм [93]. Везикуло-вакуолярные органеллы состоят из 79–362 везикул или вакуолей, размер которых

составляет 1–2 мкм и в совокупности занимает 16–18 % веноулярной эндотелиальной цитоплазмы. Отдельные везикулы и вакуоли значительно больше, чем кавеолы (в среднем диаметр 70 нм) эндотелиальных клеток капилляров. В отличие от кавеол, везикуло-вакуолярные органеллы представляют собой якорные структуры, которые в некоторых случаях могут собираться в трансклеточные мембранные каналы. Эти каналы открываются в просвет, а также на боковую поверхность эндотелиальной клетки, но их функция в регулировании проницаемости соединений неизвестна. Каналообразующие везикуло-вакуолярные органеллы обеспечивают путь трансцеллюлярной проницаемости для макромолекул [64].

Эндоцитоз

Эндоцитоз - процесс, который клетки используют для доставки внеклеточного материала и плазматической мембраны внутрь клетки. Эндоцитоз был обнаружен с развитием электронной микроскопии, которая позволила визуализировать специализированные мембранные домены, ответственные за два механистически и морфологически различных пути: клатрин-опосредованный [94] и кавеолин-опосредованный эндоцитоз [95]. Селективное ингибирование этих двух путей позже привело к открытию холестерин-чувствительных, клатрин- и кавеол-независимых путей [96].

После интернализации жидкости, мембранные белки и мембранные липиды перемещаются в разные компартменты: в поздние эндосомы и лизосомы для деградации, или возвращается обратно в плазматическую мембрану, в транссет Гольджи. Эндоцитоз важен для передачи сигналов и регуляции рецепторов клеточной поверхности, доставки питательных веществ в клетку, установления и поддержания клеточной полярности и обмена белков и липидов плазматической мембраны. Кроме того, бактериальные токсины и патогены используют эндоцитоз как способ проникновения внутрь клетки. Понимание того, как происходит этот процесс и как он регулируется, является целью многих исследователей, усложняет эти исследования тот факт, что эндоцитоз имеет разные формы [97].

Клатрин-опосредованный эндоцитоз

Наиболее изученным механизмом эндоцитоза является клатрин-опосредованный эндоцитоз, который происходит через покрытые клатрином ямки и покрытые клатрином везикулы [94]. Впервые было обнаружено, что клатрин-опосредованный эндоцитоз играет важную роль в захвате клетками ЛПНП [98] и трансферрина [99] после связывания их с соответствующими рецепторами. Основными компонентами покрытых клатрином везикул являются тяжёлая и лёгкая цепи клатрина [100], от которых путь получил своё название, и четыре субъединицы комплекса гетеротетрамерного адаптерного белка 2 [101]. Комплекс адаптерного белка 2 связывает клатриновую оболочку с бислоем мембраны и также является основной молекулой распознавания рецепторов [102]. Существуют и другие специализированные адаптерные белки, вместе называемые клатрин-сортирующие белки [103], каждый из которых распознает отдельные мотивы на соответствующих рецепторах. Эти специфичные для рецептора адаптерные белки часто взаимодействуют как с клатрином, так и с комплексом адаптерного белка 2.

Клатрин-опосредованный эндоцитоз проходит через несколько стадий: инициация покрытых клатрином ямок, отбор рецептора, рост и созревание покрытых клатрином ямок, расщепление и высвобождение содержимого покрытых клатрином везикул и, наконец, снятие покрытия. Сборка покрытых клатрином ямок инициируется комплексами адаптерного белка 2 [103]. Комплексы адаптерного белка 2 быстро связывают клатрин. Полимеризация клатрина стабилизирует кривизну ямки [104].

Высвобождение зрелых покрытых клатрином везикул из плазматической мембраны осуществляется с участием от ГТФазы динамина [105]. Наконец, как только везикула отделяется от плазматической мембраны, клатриновая оболочка разбирается с помощью АТФазы, белка Hsc70 и его кофактора ауксина. Это позволяет непокрытой везикуле перемещаться и сливаться со своей целевой эндосомой [106].

Кавеолин-зависимый эндоцитоз

Эндоцитоз, опосредованный кавеолами, является вторым наиболее изученным эндоцитарным путем. Было обнаружено, что кавеолин-опосредованный эндоцитоз играет важную роль в трансцитозном переносе различных веществ через эндотелий [107, 108]. Кавеолы, везикулярные переносчики трансцеллюлярного пути, до недавнего времени были мало изучены. Однако теперь с идентификацией ряда ассоциированных с кавеолами регуляторных белков, динамина, интерсектина и кавеолина-1, растёт понимание фундаментальной важности этого пути в транспорте белков плазмы. Кавеолы, представляют собой инвагинации плазматической мембраны в форме колбы с диаметром 50–100 нм, в большом количестве присутствуют на многих, но не на всех плазматических мембранах эукариот [109, 110]. Кавеолы пересекают цитоплазму, достигая базолатеральной поверхности, где они высвобождают своё содержимое путем экзоцитоза.

Основные структурные белки кавеол являются членами семейства кавеолиновых белков, наиболее распространённым из которых является кавеолин-1. Кавеолин-1 представляет собой небольшой интегральный мембранный белок, который встраивается в цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны для обеспечения интернализации кавеол. Цитозольный N-концевой участок кавеолина-1 связывается с холестерином и функционирует как каркасный домен, который связывается с важными сигнальными молекулами [111].

Известно, что отпочкование кавеол от плазматической мембраны регулируется киназами и фосфатазами [112], поскольку многочисленные исследования показали, что их химическое ингибирование либо подавляет (в случае ингибиторов киназ), либо усиливает (в случае ингибиторов фосфатаз) кавеолин-зависимый эндоцитоз. Наконец, подобно клатрин-опосредованному эндоцитозу, динамин необходим для отщепления пузырьков кавеол от плазматической мембраны [113, 114].

В дополнение к роли кавеол в эндоцитозе, следует отметить их участие в качестве сигнальных платформ, регуляторов липидного метаболизма и чувствительности клеточного поверхностного натяжения [111].

Кавеолин-1 и кавеолы, по-видимому, играют важную роль в развитии атеросклеротических поражений артерий. Разработка новых препаратов, регулирующих экспрессию кавеолина-1, может иметь важное значение для профилактики или лечения атеросклеротических заболеваний сосудов [115].

С помощью кавеолин-опосредованного эндоцитоза происходит, например, транцитоз альбумина. Транцитоз альбумина представляет особый интерес из-за его способности контролировать концентрацию тканевого альбумина и, следовательно, регулировать трансвакулярный градиент онкотического давления [116, 117]. Механизм транцитоза альбумина схематически представлен на Рис. 4.

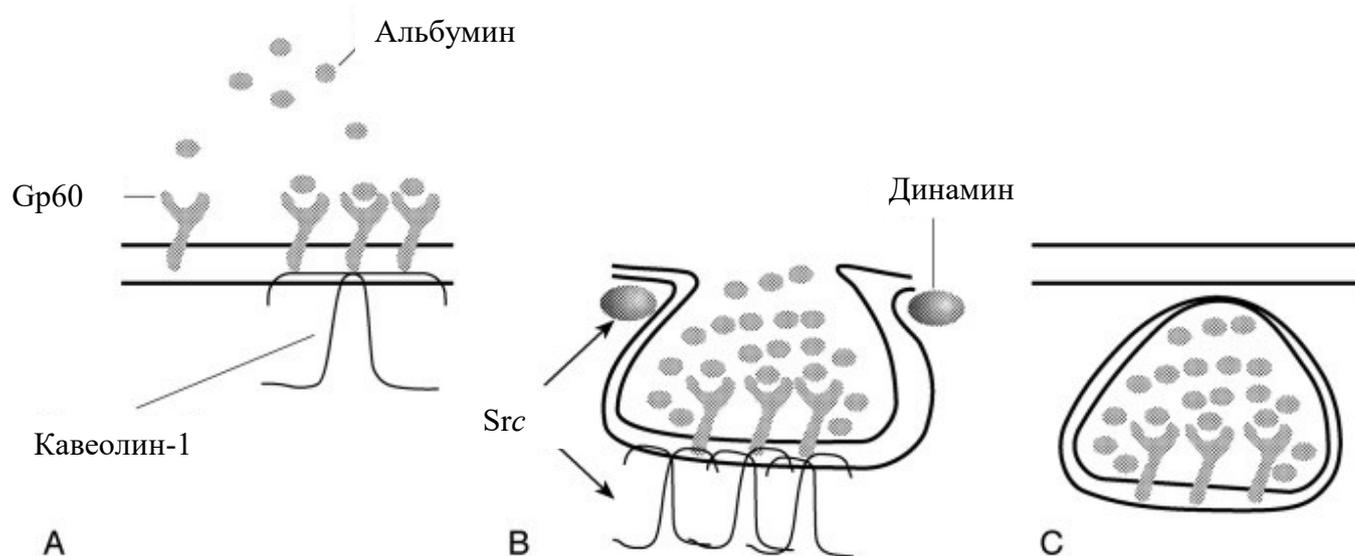


Рисунок 4. Кавеолы ответственны за трансцеллюлярный транспорт в эндотелиальных клетках. Кавеолы могут быть переносчиками альбумина. Связывающие альбумин белки (альбумин-связывающий гликопротеин, grb6) инициируют эндоцитоз альбумина, связываясь с каркасным белком кавеолином-1 (а) и активируя киназу Src (протеинкиназа или тирозинкиназа). Фермент Src фосфорилирует кавеолин-1 и второй белок-динамин (b). Это приводит к делению кавеол и интернализации альбумина (c) [38].

Клатрин-независимый эндоцитоз

Кроме вышеописанных существуют и другие различные по механизму пути эндоцитоза, опосредующие поглощение различных рецепторов передачи сигналов, адгезии и питательных веществ, а также регулирующие поверхностную экспрессию мембранных транспортеров. Было показано, что эти пути являются

клатрин-независимыми эндоцитарными путями, и, как следует из названия, эндоцитарные пузырьки/каналы, участвующие в клатрин-независимом эндоцитозе, не имеют отчётливой оболочки и их нелегко обнаружить с помощью электронной микроскопии. Таким образом, эти пути были впервые обнаружены благодаря их устойчивости к ингибиторам, блокирующим клатрин-опосредованный эндоцитоз и кавеолин-опосредованный эндоцитоз [118]. Роль этих клатрин-независимых эндоцитарных путей в клетке и степень вклада в эндоцитарную способность клетки, остаются неясными.

1.3.1. Факторы, оказывающие влияние на трансэндотелиальную проницаемость

Факторы воспаления

Механизмы, с помощью которых медиаторы воспаления меняют структуру эндотелиальных соединений, недостаточно изучены. К примеру, в эндотелиальных клетках под действием 1 мМ перекиси водорода, 0,1 мМ гистамина или 4 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) снижается количество VE-кадгерина на поверхности клетки. Перекись водорода и ЭДТА вызывали устойчивое снижение поверхностного VE-кадгерина, тогда как гистамин (0,1 мМ) понижал поверхностный VE-кадгерин только через 5 и 15 мин, а не через 30 и 60 мин. Связывание VE-кадгерина с цитоскелетом уменьшалось под действием ЭДТА, но не уменьшалось под действием гистамина или перекиси водорода. Следовательно, способствуя разрушению соединительных кадгеринов, медиаторы воспаления способны понижать адгезивные связи между прикрепленными эндотелиальными клетками и увеличивать таким образом проникновение растворенных веществ [119].

Фактор некроза опухоли альфа.

Цитокины и хемокины представляют две важные группы белков, которые контролируют иммунную систему человека. Нарушение регуляции сети, в которой действуют эти иммуномодуляторы, может привести к неконтролируемому воспалению [120].

Фактор некроза опухоли альфа представляет собой воспалительный цитокин, продуцируемый макрофагами/моноцитами во время острого воспаления, и отвечает за широкий спектр сигнальных событий в клетках, ведущих к некрозу или апоптозу. Считается, что TNF α способствует дисфункции лёгочного сосудистого барьера при взаимодействии с рецептором TNF α -1, что приводит к повышенной проницаемости для белков. Существует ряд структурно связанных «рецепторов-ловушек», которые действуют, связывая молекулы TNF α , тем самым предохраняя клетки от апоптоза [121, 122].

Этот цитокин обладает многочисленными действиями, которые можно разделить на четыре группы: 1) противоопухолевое действие; 2) иммуномодулирующая и провоспалительная активность; 3) влияние на обмен веществ; 4) прочие функции. TNF α является причиной гипертриглицеридемии и кахексии, которые характерны для хронических инфекций и новообразований. Высвобождение TNF α влияет на местное и системное повреждение в экспериментах с ишемией-реперфузией печени, которое было значительно снижено предварительной обработкой анти-TNF – препаратом [123, 124].

К тому же, TNF α приводит к усилению экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и E-селектина на эндотелиальных клетках [125], тем самым способствуя адгезии нейтрофилов к эндотелию.

C-реактивный белок

C-реактивный белок (CRP) является эволюционно консервативным белком, который участвует в системе врождённого иммунитета. CRP состоит из пяти идентичных глобулярных субъединиц, которые образуют пентамер, но роль пентамерного CRP (pCRP) при воспалительном патогенезе остаётся спорной. Новые данные свидетельствуют о том, что pCRP может диссоциировать на мономерный CRP (mCRP), который играет важную роль в защите хозяина и воспалении [126, 127, 128].

Его концентрация в плазме увеличивается при воспалении, что давно используется в клинических целях. CRP - это молекула распознавания образов, связывающаяся с определёнными молекулярными конфигурациями, которые

обычно подвергаются воздействию во время гибели клеток или обнаруживаются на поверхности патогенов. Быстрое увеличение синтеза CRP в течение нескольких часов после повреждения ткани или инфекции предполагает, что он способствует защите организма и является частью врождённого иммунного ответа. У людей уровни CRP в плазме могут повышаться в 1000 раз или более, после острого воспалительного стимула.

В последнее время в проспективных исследованиях была установлена связь между повышением уровня CRP в крови и риском серьёзных сердечно-сосудистых событий. Это позволило Центру по контролю за заболеваниями и Американской кардиологической ассоциации издать клинические рекомендации, в которых указывается на необходимость измерения уровня CRP у пациентов ишемической болезнью сердца [129].

CRP может также активировать классический путь комплемента, стимулировать фагоцитоз и связываться с рецепторами иммуноглобулинов.

Как и многие медиаторы воспалительных процессов, CRP может оказывать множественное действие. Было показано, что CRP индуцирует экспрессию антагониста рецептора ИЛ-1 [91] и увеличивает высвобождение противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 [130], подавляя синтез IFN γ [131]. Также, CRP активирует комплемент и усиливает фагоцитоз, увеличивает высвобождение ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-18 и TNF α [132]. Таким образом, CRP может либо усиливать, либо ослаблять воспалительные реакции в зависимости от обстоятельств.

CRP играет важную роль в патогенезе атеросклероза. Так показано, что CRP связывается с фосфатидилхолином окисленных липопротеинов низкой плотности [133], активирует экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках, увеличивает захват липопротеинов низкой плотности макрофагами [134], ингибирует экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота в эндотелиальных клетках аорты, и увеличивает экспрессию и активность ингибитора активатора плазминогена-1. Исследование с использованием линии мышей, экспрессирующих трансгенный CRP и дефицитных по аполипопротеину E, показало умеренное

ускорение атеросклероза аорты у самцов животных, экспрессирующих высокие уровни CRP [135]. Другое исследование продемонстрировало повышенную артериальную окклюзию после повреждения сосуда у трансгенных мышей, экспрессирующих CRP [136]. Несмотря на эти данные, роль CRP в патогенезе атеросклероза окончательно не установлена.

Следует ещё раз отметить, что CRP может являться потенциальным модулятором сигнальных путей, связанных с тромбозом, ангиогенезом и воспалением. Способность CRP связываться и взаимодействовать с несколькими лигандами подчеркивает его роль в различных стадиях атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. CRP способствует прогрессированию атеросклероза, оказывая провоспалительные эффекты, модулируя врождённый иммунный ответ и активируя систему комплемента, способствуя активации тромбоцитов, образованию тромбов, ремоделированию сосудов и ангиогенезу [137].

Липопротеины низкой и высокой плотности

При помощи метода ультрацентрифугирования липопротеиновые частицы были разделены на следующие классы (фракции) [138]: хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины промежуточной плотности, липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Атерогенность липопротеинов перечисленных классов различна [139]. Наиболее атерогенными считают ЛПНП. Отмечено, что ЛПВП обладают антиатерогенным эффектом, при уменьшении их уровня в плазме крови риск возникновения атеросклероза резко возрастает даже при нормальном уровне общего холестерина. ЛПВП способны акцептировать излишний холестерин из периферических тканей. ЛПВП осуществляют обратный транспорт холестерина в печень, для удаления его из организма [140].

Более подробно рассмотрим интересующие нас ЛПНП и ЛПВП.

Липопротеин низкой плотности (ЛПНП) состоит из белковой и липидной части. Липиды составляют ~80 % по массе и включает более 300 различных молекулярных видов липидов, тогда как белковая часть представлена единственным белком аполипопротеином В100 (одна молекула на частицу ЛПНП)

[141]. Апо В100, один из крупнейших белков млекопитающих (~550 кДа), поддерживает структурную целостность частиц и, в отличие от более мелких аполипопротеинов, остаётся с липопротеиновой частицей на протяжении всего её жизненного цикла. ЛПНП являются основным переносчиком холестерина (2000–2700 молекул на частицу, из которых ~1700 находятся в этерифицированной форме) в плазме человека [142].

ЛПНП, как было отмечено ранее, являются наиболее атерогенным классом липопротеинов. Многие факторы риска модулируют способность ЛПНП и других атерогенных липопротеинов проходить через эндотелий и попадать в интиму артерий [143]. Несмотря на важность транспорта ЛПНП через эндотелий для атерогенеза, молекулярные механизмы этого процесса, все ещё полностью не изучены [144].

Значительный объём данных за последние годы поставил под сомнение концепцию, согласно которой движение ЛПНП происходит за счёт пассивной фильтрации (т.е. как функция размера и концентрации частиц) через повреждение эндотелиального монослоя [145]. Исследования показали, что транцитоз ЛПНП может происходить по везикулярному пути с участием кавеол, скавенджер-рецепторов В1 [146], ALK1 (activin receptor-like kinase proteins) киназы, подобных рецептору активина 1 [147], и рецептора ЛПНП [148]. Рецептор ЛПНП, по-видимому, опосредует транцитоз ЛПНП через гематоэнцефалический барьер [149]. В то же время, направленная деграция рецептора ЛПНП сосудистого эндотелия не влияла на транцитоз ЛПНП в периферических сосудах [150].

Время нахождения ЛПНП в циркуляции крови может быть критическим фактором, связанным с риском атеросклероза, поскольку оно определяет как воздействие на артериальную ткань частиц ЛПНП, так и способность ЛПНП претерпевать проатерогенные внутрисосудистые модификации, такие как окисление [151].

Механизмы, лежащие в основе повышенной скорости транцитоза ЛПНП остаются неясными, уточнение понимания откроет возможности для терапии, направленной на ранние проявления атеросклероза [152].

Субэндотелиальное накопление ЛПНП на участках артерий, восприимчивых к поражению, в основном происходит из-за избирательного удержания ЛПНП в интиме. Атерогенность ЛПНП связана со способностью его апо В100 взаимодействовать с протеогликанами артериальной стенки [153]. Удержание и последующее накопление ЛПНП в стенке артерии запускает ряд событий, которые инициируют развитие поражения. В субэндотелиальном пространстве частицы ЛПНП подвергаются различным модификациям, в том числе окислению. [154]. Модифицированные (окисленные) ЛПНП, в свою очередь, инициируют стерильную воспалительную реакцию, активируя эндотелиальные клетки, индуцируя экспрессию молекул адгезии и хемокинов, которые запускают рекрутирование моноцитов в стенку артерии [155]. В интиме моноциты дифференцируются в макрофаги, которые могут также способствовать окислению частиц ЛПНП, которые затем интернализуются макрофагами с помощью скавенджер-рецепторов, что приводит к образованию пенных клеток, нагруженных холестерином [156].

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) представляют собой небольшие, богатые белком липопротеины со средним размером 8–10 нм и плотностью 1,063–1,21 г/мл [157]. ЛПВП содержат множество других белков, включая ферменты и белки острой фазы, и небольшие количества неполярных липидов. Вследствие такого разнообразия композиционных характеристик частицы ЛПВП очень неоднородны по своим структурным, химическим и биологическим свойствам [158]. Аполипопротеин А-1 - это основной структурный и функциональный белок ЛПВП, на долю которого приходится примерно 70 % общего белка ЛПВП. Считается, что почти все частицы ЛПВП содержат апо А-1 [159]. Основные функции апо А-1 включают взаимодействие с клеточными рецепторами, активацию лецитин/холестерин-ацилтрансферазы и множественная антиатерогенная активность [160].

Исследования показали обратную корреляцию между уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и риском сердечно-сосудистых заболеваний. ЛПВП способствуют обратному транспорту холестерина и обладают

несколькими предполагаемыми атеропротекторными функциями, связанными с противовоспалительными, антитромботическими и антиоксидантными свойствами, а также со способностью поддерживать функции эндотелия. Однако предположение о том, что повышение уровня холестерина ЛПВП будет полезно при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ), было поставлено под сомнение, поскольку в большинстве клинических испытаний методы лечения, повышающие уровень холестерина ЛПВП, не приводили к улучшению сердечно-сосудистых исходов. ЛПВП от пациентов с атеросклерозом не только проявляют нарушенные атеропротекторные функции, но также приобретают проатерогенные свойства и называются «дисфункциональными» ЛПВП. Таким образом, фармакологические подходы, направленные на восстановление функций ЛПВП, могут более существенно повлиять на исход сердечно-сосудистых заболеваний, чем препараты, используемые до сих пор для повышения уровня холестерина ЛПВП [161].

Влияние напряжения сдвига и циклического растяжения

Эндотелиальные клетки *in situ*, заметно отличаются от эндотелиальных клеток, культивируемых в статических условиях из-за наличия механических сил кровотока, действующих на них. На границе потока с эндотелиальными клетками на эндотелий оказывается сила, называемая напряжением сдвига жидкости. Влияние напряжения сдвига на барьерную функцию эндотелия зависит как от скорости потока, так и от природы потока. Усилению барьерной функции может предшествовать быстрое временное ее снижение, которое сопровождается «вытягиванием» (удлинением) эндотелиальных клеток в направлении потока.

Также эндотелиальные клетки кровеносных сосудов подвергаются непрерывному циклическому растяжению либо из-за пульсирующего движения артериальной стенки (на уровне артериальных эндотелиальных клеток), либо из-за повторяющегося расширения и коллапса альвеол при нормальном дыхании (на уровне эндотелия микрососудов легких). Эти циклические движения также изменяют механические свойства эндотелиального микроокружения [162].

1.4. Тучные клетки

Тучные клетки, встречающиеся практически во всех органах и тканях (кроме хрящевой и костной), располагаются вблизи кровеносных и лимфатических сосудов, в тесном контакте с нервными окончаниями вегетативной нервной системы.

Цитоплазма зрелых тучных клеток более чем на 40 % заполнена специфическими гранулами. Основными компонентами гранул являются нейтральные протеазы (триптаза и/или химаза) и гепарин [4]. Кроме того, гранулы тучных клеток содержат важные биологически активные вещества с регуляторными свойствами: гистамин, серотонин, дофамин, хондроитинсульфат, гиалуроновую кислоту, хемотаксический фактор нейтрофилов, фактор активации тромбоцитов, нейропептиды, фосфолипиды, антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза и пероксидаза), протеазы, способные активировать калликреин, прекаликреин, обладающие свойствами эластазы и катепсина С, хемоаттрактанты нейтрофилов, производные ненасыщенных жирных кислот, иммунорегуляторные цитокины, факторы роста, активатор плазминогена тканевого типа и др. Практически для всех указанных веществ гепарин является регулятором их функций [5, 163].

Тучные клетки локализуются в подслизистом слое слизистых оболочек (особенно в кишечнике), соединительнотканном слое кожи (дерме), серозных оболочках, селезенке, периваскулярной соединительной ткани. В 1 г названных тканей содержится 10^4 – 10^6 тучных клеток.

В зависимости от содержания нейтральных протеаз, тучные клетки фенотипически могут быть разделены на подгруппы: клетки, содержащие триптазу, химазу, а также карбоксипептидазу А3 и катепсин G [164].

Однако, несмотря на различия в составе протеаз каждого из подтипов зрелых тучных клеток, их содержание может активно изменяться в зависимости от сигналов, полученных от микроокружения [165]. Возможность образования гранул тучных клеток *de novo* является гибкой системой создания необходимых

секреторных гранул, в зависимости от типа ткани и патологических состояний [166].

1.4.1. Состав гранул тучных клеток

Отличительной особенностью зрелых тучных клеток в тканях, является высокое содержание гранул в их цитоплазме. Секреторные гранулы тучных клеток разнообразны по своему составу, однако они всегда содержат протеогликаны, протеазы, вазоактивные амины, главный из которых — гистамин — реализует значительную часть эффектов при аллергических и защитных реакциях (Табл.2). В состав гранул входят также полисахариды и ферменты, прежде всего протеазы, а также дегидрогеназа, пероксидаза, РНКаза, гистидинкарбоксилаза и кислые гликозамингликаны [167]. Существуют данные, которые указывают на то, что некоторые цитокины, продуцируемые тучными клетками, такие как TNF α , основной фактор роста фибробластов (bFGF или FGF-2) и трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), могут выделяться из предварительно сформированных запасов, которые связаны с цитоплазматическими гранулами клеток [166].

Высвобождая содержимое гранул тучные клетки способны воздействовать на соседние клетки и формировать местное микроокружение.

После надлежащей активации тучные клетки выбрасывают некоторые из гранул в окружающую внеклеточную жидкость, где гистамин высвобождается из связи с протеогликанами, рассеивается и проявляет свои функции. Переменная фракция протеогликанов выделяется тучными клетками в растворимой форме. Другая фракция протеогликанов остается внутри клетки связанной с нейтральными протеазами в виде протеазо-протеогликановых комплексов. Остатки гранулята способны взаимодействовать с частицами липопротеинов и, благодаря своей протеолитической активности, вызывать модификацию липопротеиновых частиц [168].

Гепарин, выделяясь из активированных тучных клеток в окружающую среду, практически сразу образует комплексы с протеазами (химазой, триптазой), с которыми существовал в гранулах, образуя структуры с высоким отрицательным

зарядом и большой молекулярной массой (до 750 кДа). Эти структуры обладают очень большим сродством к ЛПНП, а также к другим основным молекулам.

Таблица 2. Состав секреторных гранул тучных клеток.

Тип	Медиатор	Функция
Биогенные амины	Гистамин	Повышение проницаемости; расширение просвета сосудов; сокращение гладких мышц; секреция соляной кислоты в желудке; зуд из-за воздействия на эндотелий, гладкомышечные клетки и нервные окончания.
Нейтральные протеазы	Триптаза	Разрушение фибриногена; расщепление компонентов комплемента C3 и C3a; калликреин-подобная активность.
	Химаза	Превращение ангиотензина в ангиотензин II; разрушение экстрацеллюлярного матрикса; повреждение эндотелия и нарушение метаболизма липопротеинов, активация матриксных металлопротеиназ, стимуляция ангиогенеза; деградация C3a, вещества P, проколлагена и цитокинов (ИЛ-6 и TNF α); стимуляции секреции слизи в бронхах; хемоаттрактант для моноцитов и нейтрофилов.
	Карбокси-пептидаза	Действует вместе с другими пептидазами, может разрушать яды змей.

Гепарин способен покидать одни сложные структуры, образуя комплексы с другими веществами. Указанные качества придают ему свойства универсального регулятора различных процессов: регуляция липидного метаболизма (активация липопротеидлипазы и связывание ЛПНП), антитромботические, антикоагулянтные, фибринолитические, противомикробные, противовирусные, иммуномодулирующие, противовоспалительные, антитоксические, антигистаминные, противоопухолевые, антиаллергические (угнетает выработку TNF α , интерлейкина-4 и подавляет лейкоцитарную инфильтрацию тканей) [163, 169]. Предполагается, что тучные клетки вносят вклад в атерогенез за счёт секреции гепарин-содержащих протеогликанов (HPG), которые, связывают ЛПНП. Связанные с HPG ЛПНП могут впоследствии захватываться в интима фагоцитирующими макрофагами, что приводит к усиленному накоплению липидов в этих клетках и прогрессированию поражения [170, 171, 172]. При этом было продемонстрировано, что тучные клетки ингибируют индуцированное макрофагами окисление ЛПНП [173].

Было обнаружено, что тучные клетки реагируют на различные экзогенные сигналы от бактерий, вирусов и паразитов через рецепторы распознавания, такие как Toll-подобные рецепторы и иммуноглобулины [174]. Тучные клетки не только участвуют в защите первой линии от патогенов, но также представляют важные медиаторы при таких заболеваниях, как аллергия и астма, когда они перестают регулироваться в ответ на избыток аллергена или аллерген-специфического иммуноглобулина E (IgE) [166, 175].

1.4.2. Терапевтический потенциал тучных клеток

Экспериментальные исследования указывают на важную роль тучных клеток в патогенезе не только ряда иммунных заболеваний, но и в различных сердечно-сосудистых. Было обнаружено, что периваскулярные, а также интимальные тучные клетки вносят существенный вклад в патогенез атеросклероза и дестабилизацию бляшек (рис. 5). Тучные клетки располагаются в периваскулярной ткани здоровых артерий, и во время прогрессирования атеросклероза клетки накапливаются в

адвентиции и плечевой области атеросклеротической бляшки. Также сердце - один из органов, богатых тучными клетками. Весь набор медиаторов, высвобождаемых тучными клетками после их активации, предполагает, что они могут участвовать в развитии атеросклероза [6].

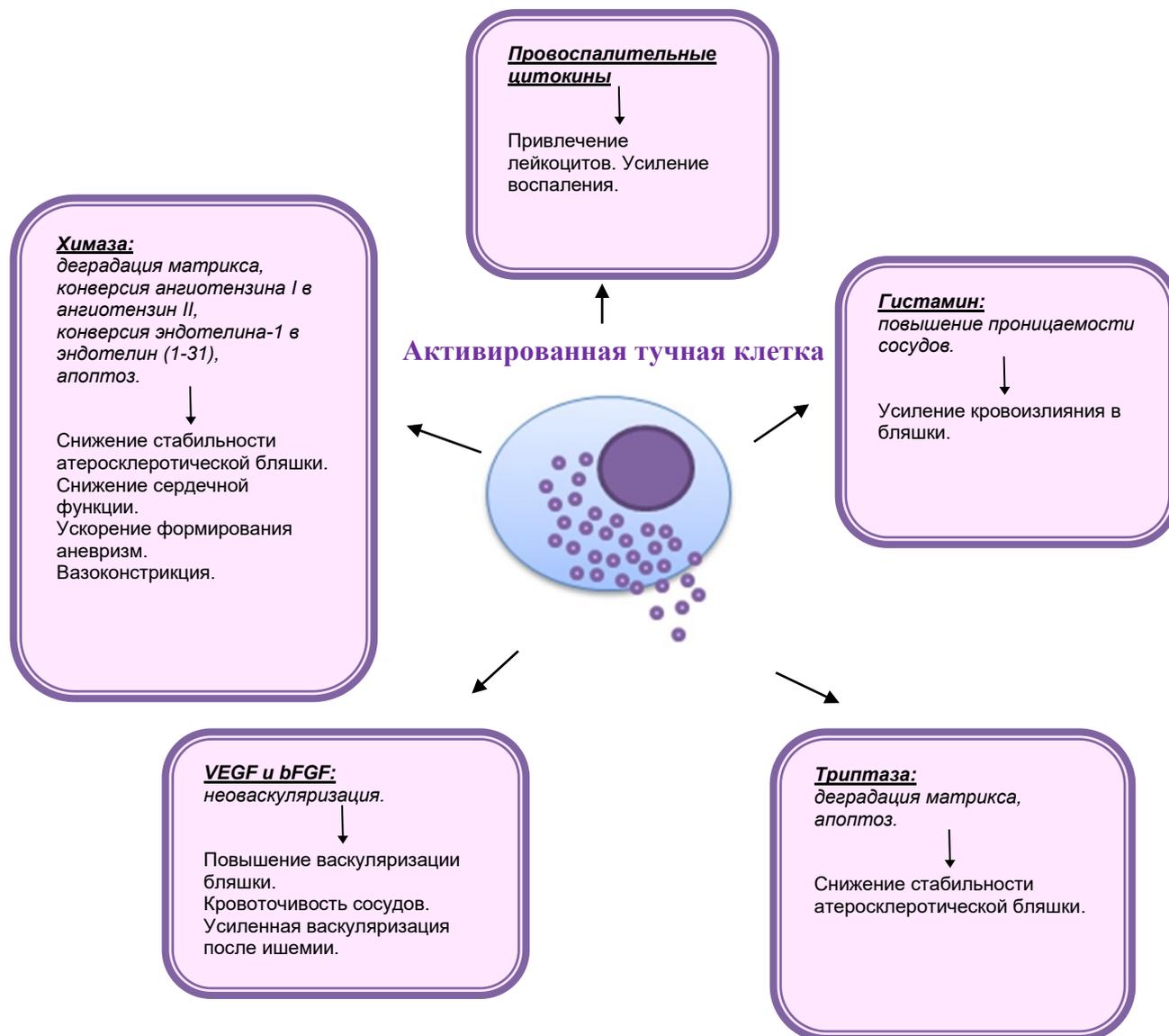


Рисунок 5. Медиаторы тучных клеток, принимающие участие в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [6].

Тучные клетки способствуют процессу накопления липидов, деградации матрикса, апоптозу клеток, увеличивают приток лейкоцитов в бляшку и усиливают проницаемость из микрососудов, что приводит к резкому увеличению риска внутрибляшечного кровоизлияния, дестабилизации и разрыва бляшки. Во-вторых, тучные клетки вносят важный вклад в формирование аневризм за счёт

высвобождения химазы, также было замечено участие ИЛ-6 и IFN γ тучных клеток. Исследования роли тучных клеток и их компонентов в сердечно-сосудистых заболеваниях могут иметь высокий терапевтический [6].

Продукты тучных клеток, такие как гистамин, простагландин D2 и лейкотриены, принимают участие в атерогенезе и его клинических проявлениях, влияя на функцию эндотелиальных клеток и вазореактивность. Эта гипотеза подкрепляется недавним открытием, что увеличение количества тучных клеток в адвентиции коронарных артерий связано с вазоспазмами [7].

Как отмечалось ранее, тучные клетки интимы содержат триптазу, и примерно 40 % клеток также содержат химазу [176]. Обе протеазы тучных клеток способны активировать матричные металлопротеиназы, что приводит к деградации коллагена и эластина, следовательно, и к дальнейшей дестабилизации бляшки [177]. Химаза, способствует сужению сосудов, превращая ангиотензин I (AngI) в ангиотензин II (AngII), независимо от фермента, превращающего ангиотензин-I [178, 179]. Кроме того, было продемонстрировано, что химаза превращает большой ET-1 в эндотелин длиной в 31 аминокислоту (ET 1-31), который также обладает сосудосуживающим действием [180, 181]. Также, химаза тучных клеток способна расщеплять апо E и апо A-2, что приводит к снижению оттока холестерина из макрофагов, усиливая образование пенистых клеток [182].

Дегрануляцию тучных клеток, могут вызывать, окисленные ЛПНП, модифицированные в интимае, что приводит к прогрессированию атеросклеротических поражений [183]. Секреция хемокинов MCP-1 (белок хемотаксиса моноцитов), и ИЛ-8 тучных клеток также увеличивает приток лейкоцитов в бляшки [184]. Предшественники тучных клеток также могут поступать в бляшку во время прогрессирования бляшки вместе с другими провоспалительными клетками, такими как моноциты и лимфоциты.

Очаги скопления тучных клеток были обнаружены в интимае на более поздних стадиях образования бляшек, в основном, неподалеку от бляшек и в областях ранней кальцификации бляшки [3]. Тучные клетки привлекаются в бляшку хемокинами и прикрепляются к компонентам внеклеточного матрикса,

таким как фибронектин, витронектин или ламинин [185]. Кроме того, тучные клетки могут активироваться при связывании с молекулами внеклеточного матрикса, высвобождая различные цитокины в окружающую среду [186]. Тучные клетки могут также влиять на стабильность атеросклеротической бляшки за счёт привлечения новых воспалительных клеток. Действительно, локальная активация тучных клеток в артериальной стенке активирует поступление лейкоцитов в интиму. Это может быть вызвано высвобождением хемокинов из тучных клеток, например, ИЛ-8 или опосредоваться активацией молекул адгезии на эндотелиальных клетках [187].

Не совсем ясно, способны ли адвентициальные тучные клетки модулировать процессы в интиме и способствовать прогрессированию бляшек, хотя имеются данные, которые косвенно свидетельствуют об этом [188].

Постоянная активация тучных клеток в интиме может приводить к прогрессированию атеросклеротических поражений из-за усиления инфильтрации лейкоцитов и накопления липидов, а также деградации матрикса. Острая очаговая активация тучных клеток в районе нестабильных поражений может способствовать кровоизлиянию в бляшках, или даже может привести к разрыву фиброзной крышки при высвобождении протеаз. Это вызывает образование тромбов и острые сердечно-сосудистые события. Таким образом, активация тучных клеток может оказывать существенное влияние на развитие бляшек и их состав.

Подводя итог, можно сказать, что тучные клетки секретируют ряд проатерогенных медиаторов в бляшках (табл. 3), что приводит к усилению адгезии и притока лейкоцитов, деградации матрикса, усиленному образованию пенистых клеток, апоптозу сосудистых клеток и росту микрососудов, что способствует прогрессированию и дестабилизации бляшек [189].

Таблица 3. Возможные эффекты медиаторов тучных клеток на атеросклеротическую бляшку.

Медиатор тучных клеток	Эффекты
Гепарин	Связывает ЛПНП, усиливает образование пенистых клеток
Гистамин	<ul style="list-style-type: none"> • Повышает проницаемость сосудов • Повышенная частота кровоизлияний в бляшке • Вызывает апоптоз макрофагов
Триптаза	<ul style="list-style-type: none"> • Индуцирует экспрессию белка хемоаттрактанта моноцитов (CCL2) и ИЛ-8 эндотелиальными клетками • Дегградация матрицы, дестабилизация бляшки • Вызывает апоптоз макрофагов
Химаза	<ul style="list-style-type: none"> • Дегградация матрицы, дестабилизация бляшки • Вырабатывает дисфункциональные ЛПВП, тем самым снижая способность индуцировать отток холестерина из пенистых клеток макрофагов. • Вызывает апоптоз эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток сосудов, макрофагов. • Вызывает набор нейтрофилов • Повышенная частота кровоизлияний в бляшке
Ил-6	<ul style="list-style-type: none"> • Повышение регуляции молекул адгезии на эндотелиальных клетках <p style="text-align: center;">Усиливает прогрессирование атеросклеротической бляшки</p>
Ил-8	Вызывает рекрутирование лейкоцитов в атеросклеротическую бляшку

IFN γ	Усиливает прогрессирование атеросклеротической бляшки
TNF α	Повышение регуляции молекул адгезии на эндотелиальных клетках
CCL2	Вызывает рекрутирование лейкоцитов в атеросклеротическую бляшку
VEGF	Может вызывать неоваскуляризацию бляшек
bFGF	Может вызывать неоваскуляризацию бляшек

1.4.3. Активаторы тучных клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях

Остается вопрос, как тучные клетки активируются в атеросклеротической бляшке. Тучные клетки могут быть активированы рядом путей, один из которых IgE-зависимый путь, инициируемый аллергеном, связанным с рецепторами Fc ϵ на поверхности тучных клеток. Было показано, что иммунные комплексы «окЛПНП–IgG» активируют тучные клетки человека через рецепторы Fc γ в культуре клеток [190]. Таким образом, можно предположить, что циркулирующие факторы, которые попали в атеросклеротическую бляшку, или факторы, которые образовались в бляшке, могут вызывать локальную активацию тучных клеток, и что такие эффекты не обязательно могут отражаться соответствующими системными параметрами. Например, липиды бляшек могут непосредственно участвовать в активации тучных клеток в стенке сосуда. Окисление ЛПНП, как было установлено, вызывает активацию тучных клеток и последующее рекрутирование лейкоцитов [191], и индуцирует секрецию проатерогенных цитокинов посредством TLR4. В связи с этим было отмечено, что TLR4-опосредованная активация тучных клеток вызывает дестабилизацию бляшек [192].

Другой потенциальный механизм активации тучных клеток действует через систему комплемента. Было показано, что тучные клетки внутри бляшки экспрессируют рецепторы для специфических компонентов комплемента, в частности для C5a, C5aR [193]. Кроме того, активированный комплемент

присутствует в атеросклеротической бляшке [194], подпитывая гипотезу опосредованной комплементом активации тучных клеток. Наконец, дегрануляция тучных клеток в адвентиции, может индуцироваться нервной системой. В образцах ткани человека было обнаружено, что тучные клетки соединяются с нервными волокнами [195]. Тучные клетки экспрессируют множество рецепторов нейропептидов, таких как вещество P, что делает возможным активацию тучных клеток нейропептидами, в частности, во время острого стресса. Кроме того, недавно было показано, что нейропептид Y индуцирует прогрессирование атеросклеротического поражения, по крайней мере частично, за счёт повышенной активации периваскулярных тучных клеток [196]. Совокупность этих данных говорит о том, что нейропептиды могут действовать как потенциальные активаторы тучных клеток при атеросклерозе и что они напрямую связывают активацию нейронов с воспалением сосудов и, возможно, с острыми сердечно-сосудистыми событиями. Таким образом, экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* предоставили нам ряд потенциальных активаторов тучных клеток при атеросклерозе (табл. 4); однако необходимо понимать, что фактические эндогенные триггеры активации тучных клеток у пациентов с ССЗ всё ещё остаются недостаточно известными и должны быть определены в дальнейшем [189].

Таблица 4. Возможные активаторы тучных клеток при атеросклерозе.

Активатор	Описанные результаты активации
IgE	Дегрануляция путем сшивания FcεR, что приводит к высвобождению протеаз, факторов роста, цитокинов и т. д.
Иммунные комплексы окЛПНП-IgG	Высвобождение цитокинов, в частности TNFα, ИЛ-8 и CCL2, через рецепторы Fcγ.

окЛПНП	Индукцирует утечку альбумина <i>in vivo</i> , возможно, за счёт высвобождения гистамина, и индуцирует высвобождение TNF α , ИЛ-6 и CCL2 через TLR4 <i>in vitro</i> .
ЛПС	Цитокины, такие как ИЛ-6, но также некоторое высвобождение протеаз через TLR4.
Лизофосфатидная кислота (LPA) (фосфолипидное производное, действующее как липидная сигнальная молекула)	Высвобождение триптазы и CCL2 через рецептор 1 LPA.
C5a	Высвобождение триптазы и CCL2 через C5aR.
Вещество P	Химаза и триптаза через NK ₁ R.
Нейропептид Y	Триптаза и ИЛ-6.

1.4.4. Роль гистамина, выделяемого тучными клетками, в регуляции эндотелиальной проницаемости

Гистамин, один из классических медиаторов воспаления, представляет собой низкомолекулярный амин, синтезированный из L-гистидина с помощью гистидиндекарбоксилазы [197, 198]. Гистамин увеличивает проницаемость венул и вызывает образование промежутков между эндотелиальными клетками. Повышение проницаемости носит временный характер и длится всего несколько минут при непрерывном действии гистамина [11].

Гистамин хорошо известен как регулятор вазодилатации и функции эндотелиальных клеток [8]. Отмечено увеличенных уровней гистамина в коронарных артериях пациентов с ишемической болезнью сердца и повышенными уровнями гистамина в циркуляции пациентов с вариантной стенокардией [9, 10].

Воспалительные реакции и реакции гиперчувствительности, вызванные гистамином, опосредуются через семейство из четырёх различных рецепторов, связанных с G-белками, – H_1R , H_2R , H_3R и H_4R [199]. На сосудистой эндотелии экспрессируется H_1 -рецептор, он ответственен за сосудистые эффекты гистамина [12].

Гистамин может взаимодействовать с различными субпопуляциями клеток, участвующими в иммунных и воспалительных реакциях, также он способен модулировать их активность [200]. Предполагается, что гистамин может влиять на разные этапы иммунного процесса. Основываясь на этом, его можно рассматривать как значимый модулятор воспалительных и иммунных процессов.

На эндотелиоциты гистамин действует синергично с другими воспалительными стимулами, что предполагает их совместное участие в регуляции проницаемости сосудов в норме и при воспалительном процессе [201].

Известно, что в высоких концентрациях гистамин накапливается и хранится в гранулах тучных клеток [202]. Выброс гистамина в результате экзоцитоза способствует быстрому увеличению проницаемости сосудов. В подтверждение этого, антигистаминные препараты эффективно снижают сосудистую проницаемость [13]. В первые минуты гистамин эффективно увеличивает проницаемость эндотелия, но через 15 мин запускается обратный процесс, — уменьшение проницаемости. К примеру, при воздействии гистамина на отдельные венулы в брыжейке крысы, проницаемость первоначально увеличивалась в среднем в пять раз, достигая пика примерно к третьей минуте, а затем постепенно снижалась. Таким образом, эффект гистамина реализуется довольно быстро, но также быстро прекращается [11]. Время полураспада гистамина составляет примерно 1 мин [203]. Эта особенность важна для сосудистого гомеостаза, так как он обеспечивает сохранение белков плазмы внутри сосудов. Механизмы действия гистамина на сосудистую сеть при острых воспалительных реакциях также хорошо описаны и являются результатом активации двух типов первичных рецепторов гистамина, — H_1 и H_2 [204].

Рецептор H_1 наиболее широко представлен на эндотелиальные клетки вен и ответственен за большинство острых сосудистых эффектов гистамина. Гистамин значительно увеличивает проницаемость эндотелия путём образования промежутков между эндотелиальными клетками, что приводит к экстравазации жидкости, а также белков плазмы [14].

Таким образом, гистамин является в первую очередь медиатором аллергического воспаления, однако и гистамин и его рецепторы обнаруживаются на клетках в атеросклеротических поражениях [15]. Было показано, что гистамин вызывает изменения формы культивируемых эндотелиальных клеток, усиливает мобильность и ускоряет рост клеток и производство простаглицлина.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Культивирование адгезионных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и суспензионных тучных клеток линии НМС-1.

2.1.1. Тучные клетки линии НМС-1

Тучные клетки (ТК) линии НМС-1 для представленной работы были предоставлены профессором J.H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN). Данная линия клеток была получена от пациента с тучноклеточной лейкемией и зарегистрирована в 1988 году. Используемые в экспериментах тучные клетки линии НМС-1 по многим своим характеристикам подобны соединительнотканым ТК. Клетки линии НМС-1 обладают многими свойствами, характерными для ТК: экспрессируют kit-рецептор, продуцируют гистамин (в небольших количествах), гепарин, хондроитинсульфат, триптазу. Набор поверхностных антигенов клеток данной линии схож с таковым физиологически нормальных ТК человека, за исключением отсутствия на клетках НМС-1 высоко- и низкоаффинных рецепторов к IgE, из-за того, что в клетках данной линии блокирована экспрессия α - и β -цепей Fc ϵ RI [205]. В значительном количестве экспрессируется γ -цепь, которая является также частью высокоаффинного Fc γ рецептора CD64.

Данная линия тучных клеток НМС-1 представляет собой суспензионную культуру. Клетки НМС-1 культивировали в среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, «БИОЛОТ», Санкт-Петербург) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 1,2 мМ монотиоглицерола и антибиотика гентамицина (40 мкг/мл). Клетки пересевали каждые 3-4 дня, при достижении плотности клеточной суспензии $1,5-2 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки осаждали центрифугированием, отмывали в среде IMDM дважды и разводили в полной среде IMDM+10% FCS до 5 мл. Клетки инкубировали при 37 °С в присутствии 5 % CO₂. Для культивирования использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Германия).

2.1.2. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926

EA.hy926 — линия клеток эндотелия человека была предоставлена Dr. Coq-Jean C. Edgell (Университет Северной Калифорнии, США). Линия была получена путем гибридизации эндотелиальных клеток пупочной вены (HUVEC) с клетками карциномы легкого человека A-549 [206]. По своим морфологическим, фенотипическим и функциональным характеристикам клетки линии EA.hy926, сходны с эндотелиальными клетками человека [207]. Они спонтанно экспрессируют фактор фон Виллебранда, tPA, ингибитор активатора плазминогена (PAI-1), тканевой фактор и тромбомодулин. После активации клетки экспрессируют ряд адгезионных молекул (например, E селектин, ICAM-1 и VCAM-1), а также хемокины IL-8 и MCP-1.

Клетки линии EA.hy926 представляют собой адгезионную культуру. Клетки культивировали в 50-ти мл флаконах («Sarstedt», Германия), в среде DMEM (Sigma), с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки FCS (Gibco), 40 мкг/мл гентамицина (АО «Самсон», Санкт-Петербург, РФ), 2 мМ L-глутамин (Биолот), при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Клетки пересеивали через каждые 3–4 дня. Для дезинтеграции монослоя клетки инкубировали в растворе версена в течение 5–10 минут («Биолот», Санкт-Петербург, РФ).

2.2. Разработка модели культивирования клеток в двухкамерной системе с полупроницаемой мембраной

Эндотелиоциты человека линии EA.hy926 (по 10⁵ клеток на вставку) высевали на пористые вставки (Transwell, BD, США) с размером пор 1 мкм до образования конфлюентного монослоя. Вставки предварительно покрывались коллагеном I типа (Биолот, Санкт-Петербург) (70 мкг/мл в 20 мМ уксусной кислоте) в течение 1 ч при комнатной температуре, далее их промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (Биолот, Россия) и выдерживали в среде DMEM (D6546; Sigma, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (HyClone, США), в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂).

Далее конфлюэнтный монослой эндотелиальных клеток переводили в бессывороточную среду. Для этого клетки выдерживали в среде DMEM, содержащей 0.5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), в течение 1 суток.

Схема эксперимента:

Во вставки добавляли по 200 мкл культуральной среды DMEM (Sigma, США) 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.

Контролем служили вставки с добавлением растворителя (DMEM), а также вставки, покрытые коллагеном, без эндотелия (для контроля барьерных свойств монослоя эндотелия).

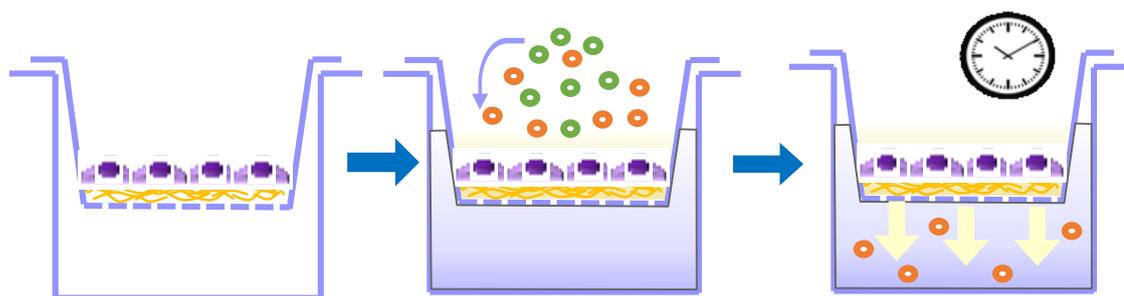
Описанная система использовалась для изучения спонтанного транспорта таких белковых молекул, как альбумин, IgM, АпоА-1, АпоВ, содержащихся в нормальной человеческой сыворотке в составе среды верхней камеры.

При изучении стимулированного трансэндотелиального транспорта липопротеинов и альбумина под влиянием факторов воспаления монослой эндотелия предварительно инкубировали в течение 24 часов в бессывороточной среде, в которой сыворотку заменял 0.5% сывороточный альбумин человека (что соответствует его содержанию в среде с 10 % сывороткой).

В верхние камеры лунок добавляли факторы воспаления в соответствующих концентрациях: очищенный С-реактивный белок человека – 200 мкг/мл, липополисахарид (ЛПС) *S. Typhimurium* – 5 мкг/мл [216], гистамин – 10^{-6} М [217], TNF α - 50 нг/мл [218] - для оценки их влияния на транспорт сывороточных белков, а также ингибиторы транспорта (уабаин – 0,584 мг/мл, аминазин (хлорпромазин) - 10 мкг/мл), ингибиторы гистаминовых рецепторов: H1 и H2 (супрастин и квамател соответственно) в концентрации 6.7 мкг/мл, принятой в клинической практике и ингибиторы сигнальных путей TNF α : p38 inh – 25 мкМ, JNK inh – 10 мкМ, MEK1/2

inh - 10 мкМ, Nf-kB inh – 0,01 мкМ [218] – для выяснения механизма транспорта. Контролем служили вставки с добавлением среды вместо факторов воспаления.

Инкубации проводили в течение 2, 4, 8, 12, 24 часов (в опытах с гистамином – также 5, 10, 15, 20, 45 и 60 мин) с забором проб из нижней камеры. Степень проникновения веществ через эндотелий оценивали по их концентрации в нижней камере. Пробы сред верхней и нижней камеры анализировали с помощью биохимических и иммунологических методов.



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

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

Рисунок 6. Схема рабочей модели культивирования клеток в двухкамерной системе с полупроницаемой мембраной

Показатель трансэндотелиального транспорта макромолекул рассчитывали, как отношение количества апоВ или альбумина в нижней камере к количеству соответствующего белка, добавленного в верхнюю камеру, и выражали в процентах. Результаты основаны на данных в среднем 4–7 экспериментов, при этом на каждое условие эксперимента использовали по 5–7 вставок, т.о. общее число повторов составило 20–28 на 1 точку.

2.3. Микроскопическое исследование монослоя

Конфлюентность монослоя оценивали при помощи светового микроскопа Leica DM6000B (Германия) в фазовом контрасте, при увеличении (x 100). Снимок создан фотокамерой Leica DFC (Германия).

2.4. Оценка конфлюентности эндотелиального монослоя при помощи FITC-декстрана (70кДа)

К эндотелиальному монослою, выращенному на трансвеллах, предварительно обработанных коллагеном, добавлялся раствор FITC-декстрана (70кДа; Sigma, США) [203, 20]. Инкубация проходила при 37 °С в течение 24 часов с забором проб из нижней камеры в определённые промежутки времени. Пробы анализировали на флуориметре (Model 680, Bio Rad, США), таким образом детектируя количество FITC-декстана, прошедшего через монослой, контролем служили трансвеллы без эндотелиальных клеток.

2.5. Оценка конфлюентности эндотелиального монослоя при помощи измерения клеточного биоимпеданса

Показатель клеточного биоимпеданса измеряли с помощью прибора: "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США).

В приборе xCELLigence® RTCA DP используется неинвазивный мониторинг электрического импеданса для количественной оценки пролиферации клеток, изменения морфологии и качества прикрепления без использования меток в режиме реального времени. Измерение состояния клеток происходит на пластинах, покрытых микроэлектродом, расположенных на дне лунок планшета, в которых культивируются данные клетки. Изменение биоимпеданса зависит от протяженности контакта клеток с электродом (от площади, занимаемой клетками на поверхности электрода), на основании этого параметра автоматически вычисляется клеточный индекс, который отражает изменения в барьерной функции и проницаемости [210].

2.6. Оценка экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках под действием TNF α методом проточной цитофлуориметрии

Определение молекул клеточной адгезии ICAM (CD54) на эндотелиальных клетках в присутствии TNF α и без него в среде DMEM по сравнению с изотипическим контролем IgG FITC осуществляли методом проточной цитофлуориметрии.

Эндотелиальные клетки растили до образования конфлюэнтного монослоя в 24-луночной планшете (Sarstedt, Германия). Инкубировали с TNF α в концентрации 50 нг/мл в течение 24 часов при 37 °С (в контроле – со средой DMEM). Клетки снимали со дна культурального планшета при помощи инкубации с раствором ацетазы в течение 5-7 минут. Далее отмывали раствором полной среды DMEM, центрифугировали и взвешивали в PBS. Суспензии стимулированных TNF α и контрольных эндотелиальных клеток разделяли каждую на 2 пробирки, в одну добавляли меченные FITC моноклональные антитела к CD54, в другую изотипический контроль – раствор мышинового иммуноглобулина IgG1, меченного FITC. Окраску производили в соответствии с рекомендациями производителя в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем пробы обрабатывали раствором Versalyse (Beckman Coulter, США) 15 мин, после чего отмывали раствором PBS. Далее клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Navios. Результаты цитометрического учета анализировали при помощи программы Kaluza.

2.7. Активация тучных клеток

Для стимуляции дегрануляции необходимое количество ТК отмывали раствором PBS и разводили суспензию клеток в растворе PBS, после чего клеточная суспензия была разделена на равные части, к которым были добавлены активаторы. Для предотвращения преждевременной дегрануляции все манипуляции проводили в водяной бане со льдом. В качестве активаторов дегрануляции использовали вещество 48/80 (Sigma) в концентрации 20 мкг/мл и термоагрегированный иммуноглобулин (IgG; ООО «Имтек, Москва) в концентрации 100 мкг/мл [208, 209]. В роли отрицательного контроля

использовались тучные клетки в PBS. Клетки инкубировали в течение 40 мин на холоде, после чего отмывали охлаждённым раствором PBS. Затем клетки разводили в требуемой концентрации в культуральной бесцветной среде DMEM (Sigma) и раскапывали по 700 мкл на лунку нижней камеры исследуемой модели.

2.8. Определение концентрации выделенного тучными клетками гистамина, используя флуороскан методом Шора

Для оценки выхода гистамина использовали модифицированный метод Шора [199]. Метод Шора – это ускоренный метод по регистрации гистамина в супернатантах.

В ходе эксперимента надосадочную жидкость (или клеточную суспензию) вносили в пробирки по 200 мкл, содержащие 72 мг NaCl. Затем добавляли по 300 мкл н-бутанола и энергично перемешивали в течение 3 минут. Затем пробы центрифугировали 3 минуты при 900 g, заново перемешивали содержимое пробирок для растворения получившегося осадка и ещё раз центрифугировали 8 мин при 900 g. После этого верхнюю фракцию (по 249 мкл) переносили в другие пробирки, в них же добавляли 456 мкл гептана и 144 мкл 0,1 N HCl, после 1-минутного перемешивания пробирки центрифугировали 5 мин при 600 g. По окончании центрифугирования по 120 мкл нижней фракции переносили в другую пробирку и вносили по 48 мкл 0,75 M NaOH. Затем добавляли по 14,4 мкл 0,05 % раствора орто-фталевого альдегида, инкубировали 4 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 24 мкл 1,25 M фосфорной кислоты [208].

Опыт проводится при постоянном перемешивании проб на вортексе. Результат измеряется га флуороскане при длине волны 360-450 нм. Затем пробы раскапывали в лунки черного 96-луночного планшета и измеряли флюоресценцию при длине волны возбуждения 350 нм и эмиссии 460 нм. По яркости флюоресценции (выраженной в относительных флюоресцентных единицах — RFU (relative fluorescent units)) судили о количестве гистамина используя калибровочную кривую.

2.9. Выделение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) из плазмы крови человека ультрацентрифугированием

ЛПНП выделяли из плазмы донора методом последовательного ультрацентрифугирования [211] в градиенте плотности NaBr ($d=1,0245-1,055$ г/мл) в роторе 70Ti при 40000 об/мин в течение 22 часов на ультрацентрифуге Beckman L90-K. Используемая плазма содержала 0.04% (вес/об) ЭДТА, 0.05% (вес/об) NaN₃, 0.001% (об/об) тразилола, 0.13% (вес/об) аминокaproновой кислоты, 0.03% (вес/об) бензамидина, 0.01% (вес/об) фенилметилсульфонилфторида, 0.001% (вес/об) сульфата гентамицина. Полученную фракцию диализовали против 0.01M фосфатно-солевого буфера (pH 7.4), содержащего 0.04% ЭДТА. Содержание белка в ЛПНП анализировали по методу Лоури в модификации Марквелла (с помощью ВСА реагента) [212, 27].

2.10. Химическая конъюгация флуоресцентных меток с ЛПНП, альбумином и бета-субъединицей холерного токсина, транспорт которых через эндотелий является предметом изучения

К растворам альбумина или ЛПНП добавляли раствор 1 M бикарбоната Na с pH 8,8 (доводя pH образцов до 9,0). К данным растворам белков добавляли соответствующие растворы флуоресцентных красителей, предварительно разведённых в EtOH. Смесь тщательно перемешивали на шейкере 80 мин при комнатной температуре в темноте. Непосредственно перед добавлением в опыт смесь белка с красителем подвергали диализу против PBS в темноте.

2.11. Измерение концентрации ЛПНП по определению содержания белка с помощью ВСА реагента

Метод основан на взаимодействии ионов Cu²⁺ с белковыми молекулами в щелочных условиях, что приводит к переходу катионов Cu²⁺ в Cu⁺, которые детектируются с высокой чувствительностью бицинониновой кислотой. В результате зеленый цвет реагента меняется на пурпурный, интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в растворе.

Реагент А: 1% Na бицинхонинат, 2% Na₂CO₃, 0.95% NaHCO₃, 0.16% Na тартрат, 0.4% NaOH, pH 11.25. Реагент В: 4% CuSO₄. Для приготовления рабочего раствора смешивали 50 мл реагента А и 1 мл реагента В. К 25 мкл раствора исследуемого белка добавляли 500 мкл рабочего раствора реагента и инкубировали 30 мин при 37 °С. Оптическую плотность полученного раствора определяли при 562 нм [213, 214].

2.12. Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения концентрации веществ (альбумина, IgM, CRP, АпоА-1, АпоВ, TNF α , ИЛ-8), прошедших через эндотелиальный монослой в нижнюю камеру системы

Определение указанных белков осуществляли иммуноферментным методом по разработанной в отделе биохимии ФГБНУ «ИЭМ» методике [215] с использованием козьих поликлональных антител к апоА-1 (R&D, США), конъюгата антител к апоА-1 («ИМТЕК», Россия), поликлональных антител кролика к альбумину человека («ИМТЕК», Россия), конъюгатов козьих антител к кроличьим Ig с пероксидазой (Abscam, США); а также с применением коммерческих тест систем для детектирования IgM (ООО «Полигност», Санкт-Петербург), ИЛ-8 (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург), TNF α (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург), CRP («Human C-reactive protein Instant ELISA»; eBioscience, США).

Концентрацию апоВ в культуральных средах определяли при помощи «сэндвич»-варианта ИФА с использованием нижних поликлональных антител кролика к апоВ человека (ИМТЕК, Россия) в разведении 1:500 и конъюгатов антител к апоВ с пероксидазой хрена (Sigma, США), приготовленных по описанному методу (Кэтти, Райкундалия, 1991), в разведении 1:50.

Концентрацию альбумина определяли при помощи прямого варианта ИФА с использованием поликлональных антител кролика к альбумину человека (ИМТЕК, Россия) в разведении 1:100000 и конъюгатов козьих антител к кроличьим Ig с пероксидазой хрена (Abscam, США) в разведении 1:20000.

2.13. Проточная цитофлуориметрия для контроля апоптоза эндотелиальных клеток при воздействии факторов воспаления.

Эндотелиальные клетки непосредственно после проведения эксперимента снимали с пористой мембраны трансвелл при помощи инкубирования с раствором акутазы (Gibco, Thermo Scientific, США) в течение 5-7 минут. Далее отмывали раствором полной среды DMEM, 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). Результаты цитометрического учета анализировали при помощи пакета программ Kaluza (Beckman Coulter, США).

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

По истечении времени инкубации эндотелиального монослоя с различными веществами согласно протоколу опыта, клетки отмывали трижды раствором гепарина в PBS и 1 раз раствором PBS без добавления гепарина. Затем в лунки с монослоем эндотелиальных клеток добавляли 2% раствор параформальдегида в PBS и инкубировали 20 мин при +4 °C, после чего трижды отмывали PBS. Лунки обрабатывали ядерным красителем DAPI (Biolegend, США) в концентрации 300 нМ, согласно инструкции. Инкубировали 15 мин, затем отмывали PBS. Клетки эндотелиального монослоя исследовали далее с помощью Лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE LCSM в комбинации с аргоновым лазером и объективами 20X и 63X (Центр коллективного пользования «Конфокальная микроскопия», Институт Физиологии им. И.П. Павлова), а также конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 META с объективами Plan-

Арочромат 20X и 63X (Отдел молекулярной генетики, ФГБНУ ИЭМ), и их программного обеспечения.

2.15. Проточная цитофлуориметрия для определения влияния ингибиторов различных типов трансцитоза и TNF α на захват ЛПНП, меченых флуорохромом Cy5, а также FITC-бета субъединицы холерного токсина эндотелиальными клетками EA.hy926.

Эндотелиальные клетки непосредственно после проведения эксперимента снимали с культурального планшета при помощи раствора акутазы в течение 5-7 минут. Далее отмывали раствором полной среды DMEM. Клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Navios. Результаты цитометрического учета анализировали при помощи пакета программ Kaluza.

2.16. Совместное культивирование клеток линий EA.hy926 и НМС-1 в двухкамерной системе

В трансвеллах (верхней части системы) выращивали эндотелиальные клетки линии EA.hy926 до конфлюентного монослоя соответственно протоколу. Для совместного культивирования клеток адгезионной и суспензионной культур в вышеописанной модели в нижнюю камеру системы добавляли тучные клетки линии НМС-1 по 10^6 клеток на 700 мкл среды (Рис.7.). Перед добавлением в нижние камеры ТК предварительно активировали в культуральной среде в течение 1 ч 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) в соответствии с целями эксперимента, с учётом заранее подобранных оптимальных концентраций (300 мкг/мл и 20 мкг/мл соответственно) [219]. Для избежания преждевременной дегрануляции тучных клеток, нагрузку мембранных рецепторов IgG и веществом 48/80 проводили на холоде при 4°C.

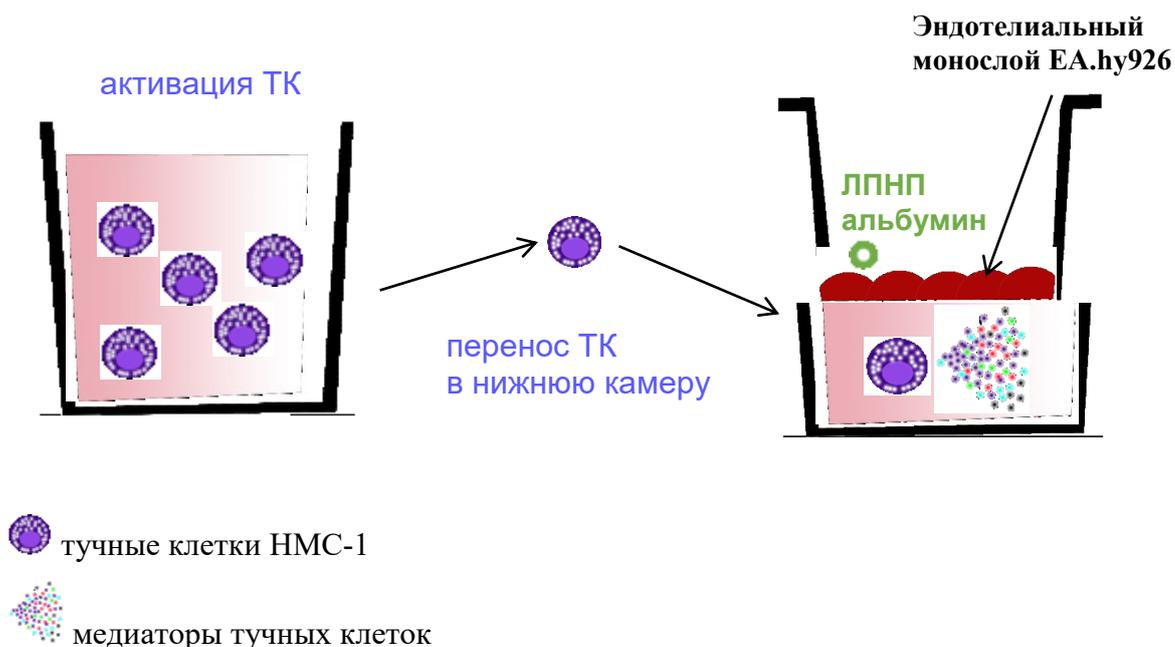


Рисунок 7. Модель совместного культивирования клеток линий EA.hy926 и HMC-1 в двухкамерной системе.

Далее в верхнюю камеру системы вносили ЛПНП или альбумин, в нижнюю только среду. Инкубацию проводили при 37°C в течение 2, 4, 8, 12, 24 часов с отбором аликвот в указанных временных точках. В пробах среды определяли концентрацию апоВ или альбумина указанными выше методами.

2.17. Статистическая обработка данных

Предварительную обработку данных проводили с помощью лицензионной 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).

В случаи нормального распределения данных применяли параметрические критерии. Поскольку в большинстве случаев наблюдается больше двух групп сравнения, то в зависимости от количества изучаемых факторов применяли однофакторный либо двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для по – парного сравнения использовано критерий Тьюки (всё со всем), либо критерий Даннета (при однофакторном анализе и сравнении показателя только с контролем), либо критерий Шидака (при двухфакторном анализе и сравнении показателя только с контролем).

В единственном случае был применён критерий Стьюдента при оценке двух групп сравнения.

В случаи ненормального распределения данных применяли непараметрический критерий Краскела - Уоллиса. Обозначены медиана и квартили, а также отличия от контрольной группы по апостериорному критерию Данна.

Результаты представляют репрезентативную выборку из ряда повторяющихся экспериментов (4 - 7) с воспроизводимыми данными, при этом внутри каждого эксперимента на определённый исследуемый случай проведено по 5-7 повторов.

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Проверка адекватности экспериментальной модели

3.1.1. Оценка конфлюэнтности эндотелиального монослоя

Микроскопическое исследование монослоя. Эндотелиальные клетки человека линии EA.hy926 растили на вставках, предварительно покрытых коллагеном первого типа для моделирования внутренней выстилки сосуда. Через сутки клетки начинают прикрепляться к поверхности, распластываться и пролиферировать, при этом к 3-4 дням инкубации образуется эндотелиальный монослой. Клетки располагаются плотно друг к другу достигая конфлюэнтности. По данным световой микроскопии, клетки после 3-4 суток культивирования образовывали плотный монослой на вставках в виде «булыжной мостовой» (Рисунок 8), что согласуется с данными других авторов, полученными на клетках линии EA.hy926 [220] и на эндотелиоцитах аорты [221].

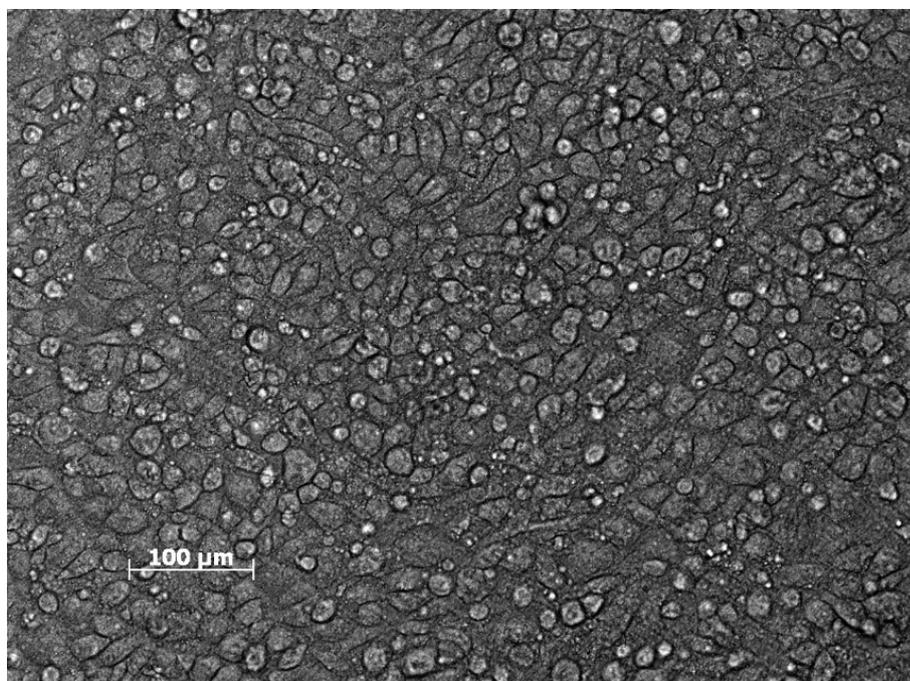


Рисунок 8. Конфлюэнтный эндотелиальный монослой. Фазово-контрастная микроскопия, объектив 10X (Zeiss, Observer.D1)

Второй способ доказательства конфлюэнтности монослоя является количественным, с помощью оценки скорости прохождения ФИТЦ-декстрана (70 кДа) через монослой эндотелиальных клеток EA.hy926. По литературным данным известно, что ФИТЦ-декстран не захватывается живыми клетками, а проходит через межклеточные промежутки (парацеллюлярно) [147]. Из графика, представленного на рисунке 9 видно, что скорость прохождения ФИТЦ-декстрана через эндотелиальный монослой в нижнюю камеру системы в десятки раз ниже по сравнению с контролем - вставок без эндотелиального монослоя (t-критерий Стьюдента: $t=17,8$ $p=0,0031$).

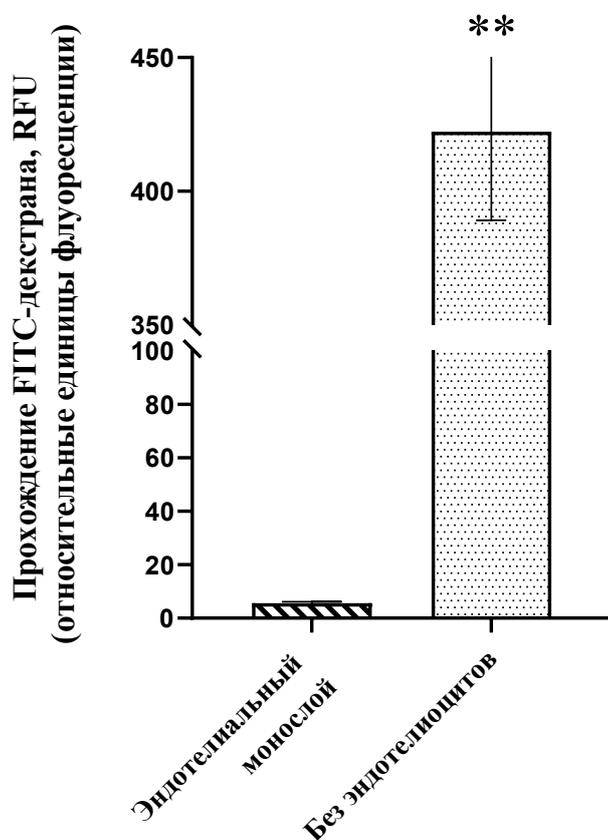


Рисунок 9. Оценка конфлюэнтности эндотелиального монослоя при помощи детектирования прошедшего ФИТЦ-декстрана (70кДа) в нижней камере системы (в % от добавленного ФИТЦ-декстрана в верхнюю камеру). Приведены средние \pm SD ($n = 15$). ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля, t-критерий Стьюдента.

3.1.2. Идентификация VE-кадгерина

Антиген CD144, также известный как VE-кадгерин, представляет собой белок из семейства молекул клеточной адгезии кадгеринов. VE-кадгерин является основным компонентом адгезионных контактов эндотелия [222]. Его экспрессия наблюдается во всех эндотелиальных клетках всех типов сосудов.

Использование флуорисцентно-меченных антител к VE-кадгерину позволило визуализировать межклеточные контакты в эндотелиальном монослое (Рисунок 10). Клетки плотно смыкаются друг с другом, чётко просматриваются межклеточные контакты на протяжении всей сети эндотелиальных клеток. Таким образом с уверенностью можно говорить о конфлюэнтности монослоя эндотелиальных клетках EA.hy926 в наших экспериментах.

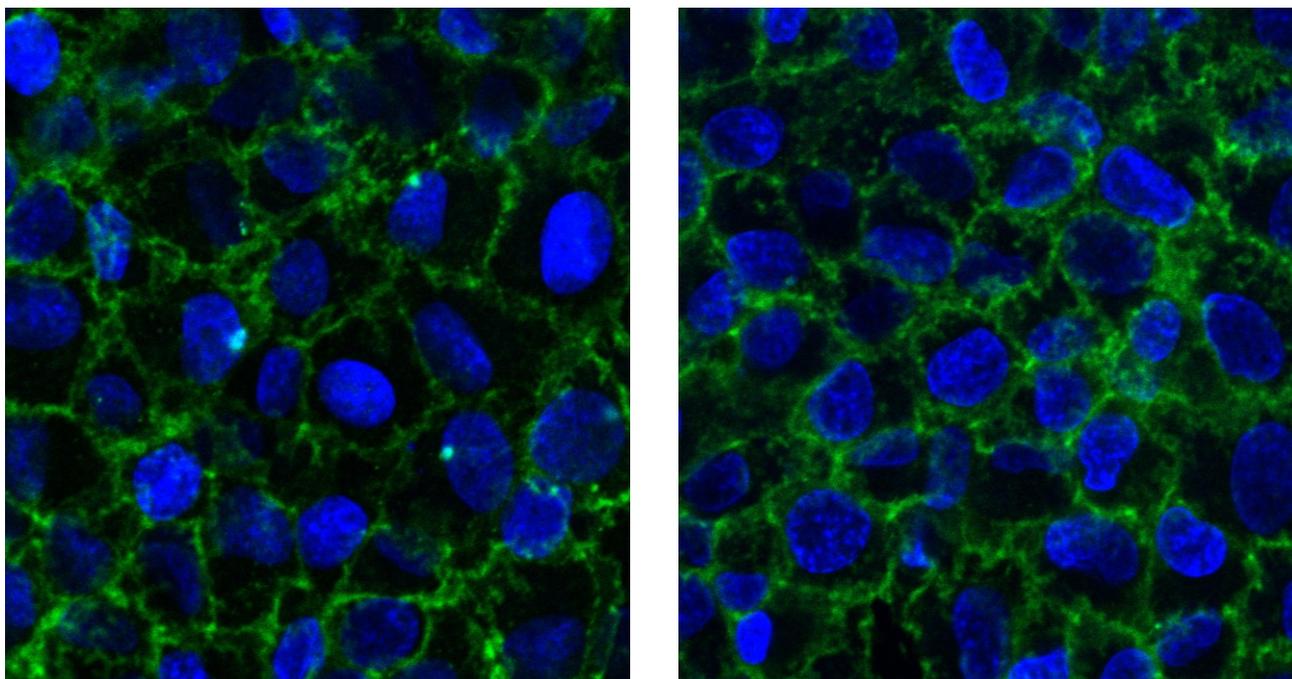


Рисунок 10. Конфокальная микроскопия (объектив 63X). Иммуногистохимия: определение VE-кадгерина (антиген CD144) на эндотелиальных клетках EA.hy926. Клетки окрашивали первичными мышиными антителами к VE-кадгерину («Biolegend», 1:100) и далее антителами к мышиным Ig, мечеными флуорохромом Alexa647 («Abcam», 1:500). Синий цвет – меченые DAPI ядра. Зелёный цвет - VE-кадгерин.

3.1.3. Транспорт различных белков плазмы через монослой эндотелия.

Для изучения транспорта различных белков плазмы через монослой эндотелия были использованы культуральные планшеты со вставками (трансвеллы), таким образом система имела две камеры, верхнюю и нижнюю, разделенные монослоем эндотелиальных клеток. В верхнюю камеру, содержащую среду ДМЕМ, добавлялась 5% сыворотка крови человека (как источник исследуемых молекул), либо выделенные белковые молекулы или липопротеины. Инкубация проводилась в течении 24 часов, при этом в определённые промежутки времени осуществлялся забор образцов из нижней камеры. После чего в полученных образцы с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) определяли содержание веществ, проникших в нижнюю камеру через монослой эндотелиальных клеток EA.hy926. Исследовался транспорт белков или надмолекулярных комплексов (липопротеины) сыворотки крови с различным молекулярным весом и размерами, таких как: альбумин (мол. вес 65-70 кДа, диаметр 3 нм [223]), IgM (мол. вес 970 кДа, диаметр 40 нм [224]), ЛПВП (диаметр 6-12 нм) и ЛПНП (диаметр 20-25 нм). 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 (мол. 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. Результаты представлены в виде гистограмм на рисунках 11, 12.

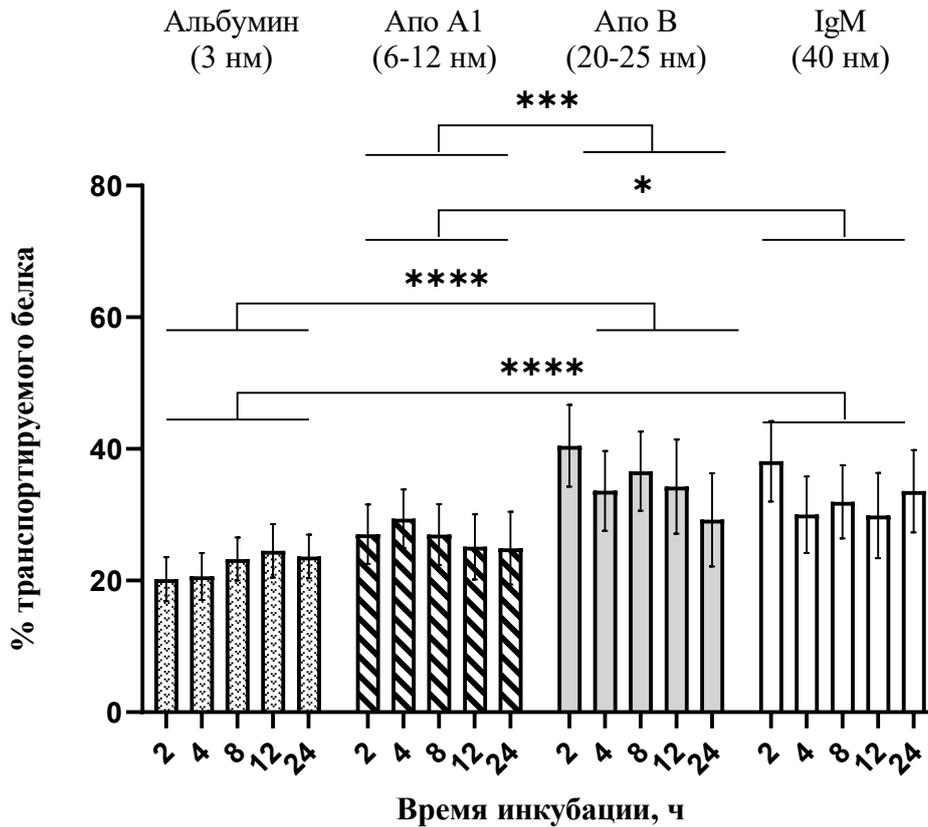


Рисунок 11. Прохождение белков и липопротеинов плазмы крови из верхней в нижнюю камеру системы через вставки, покрытые коллагеном, но без эндотелиального монослоя (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 25-30$). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный тест Тьюки. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$.

Как видно из представленных данных, эндотелиальный монослой в нашей модели проявляет выраженную барьерную функцию. В системе без эндотелиального монослоя (контроль) поступление исследуемых веществ в нижнюю камеру было более стремительным и достигало максимальных значений уже в течение 2 часов (25-40% от добавленных в верхнюю камеру) и мало изменялось в течение суток (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(4, 40) = 0,8758$ $P=0,4870$). Следует отметить, что поступление различных белковых молекул в нижние камеры в отсутствие эндотелиальных клеток было пропорционально размеру исследуемых веществ. При этом транспорт белков через вставки с монослоем эндотелиальных клеток был значительно более медленным и зависел от

времени инкубации, по истечении 24 часов через монослой эндотелиальных клеток проходило до 15% белков, что соответствует литературным данным [225].

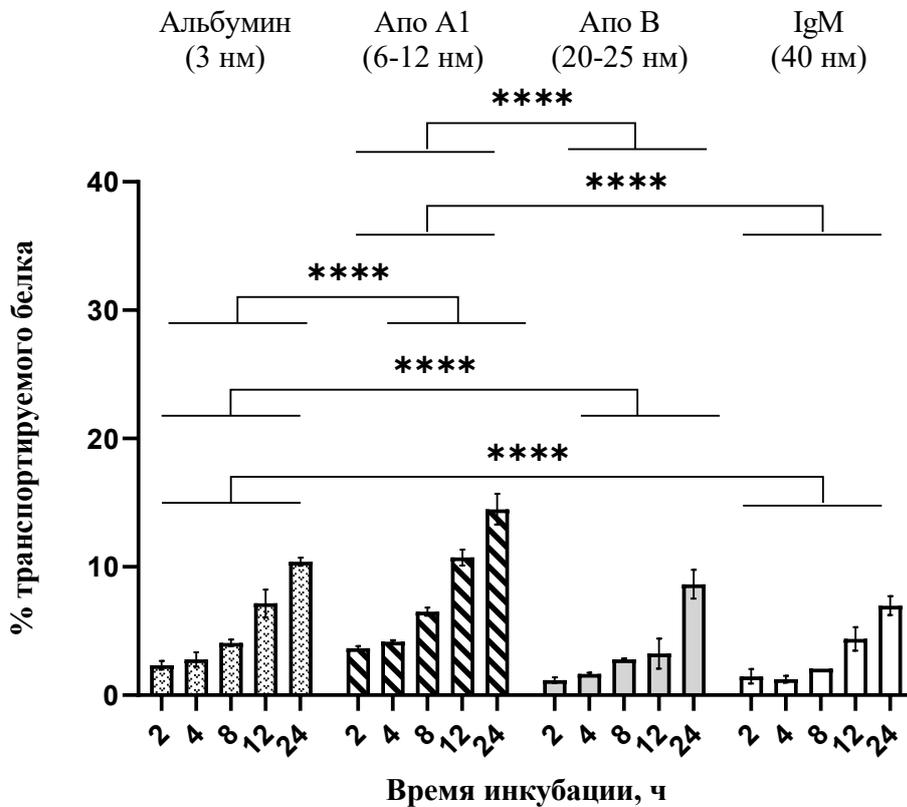


Рисунок 12. Транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через конфлюэнтный монослой эндотелиальных клеток EA.hy926 (в % от добавленных в верхнюю камеру белков и липопротеинов плазмы крови). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 25-30$). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный тест Тьюки. **** – $p < 0,0001$.

Трансэндотелиальный транспорт перечисленных выше белковых молекул достоверно различался между собой в зависимости от их размера (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(3, 40) = 16,70$ $P < 0,0001$). Относительно мелкие белки, с малой молекулярной массой (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 Апо В и IgM друг от друга не отличались (апостериорный тест Тьюки: $q = 1,35$, $p > 0,05$). Эти данные также указывают на наличие барьерных свойств у изучаемого эндотелиального монослоя, которые пропорциональны размеру транспортируемых частиц. Обратная зависимость между размерами белков и скоростью транспорта

может свидетельствовать в пользу парацеллюлярного механизма переноса данных молекул, т.е. через межклеточные промежутки, размеры которых сопоставимы с диаметром проходящих белков и липопротеинов и составляют от 4-6 до 20 нм.

Обращает на себя внимание высокая скорость прохождения через монослой эндотелиальных клеток апо А-1 (апостериорный тест Тьюки: отличие от альбумина: $q = 12,74$, $p < 0,0001$, отличие от Апо В: $q = 21,92$, $p < 0,0001$, отличие от IgM: $q = 23,28$, $p < 0,0001$). 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 70кДа была значительно ниже, чем для альбумина (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 8) = 140,9$, $p < 0,0001$), обладающего сходной молекулярной массой (Рисунок 13), что указывает специфический транспорт альбумина через эндотелиальный монослой путем транцитоза.

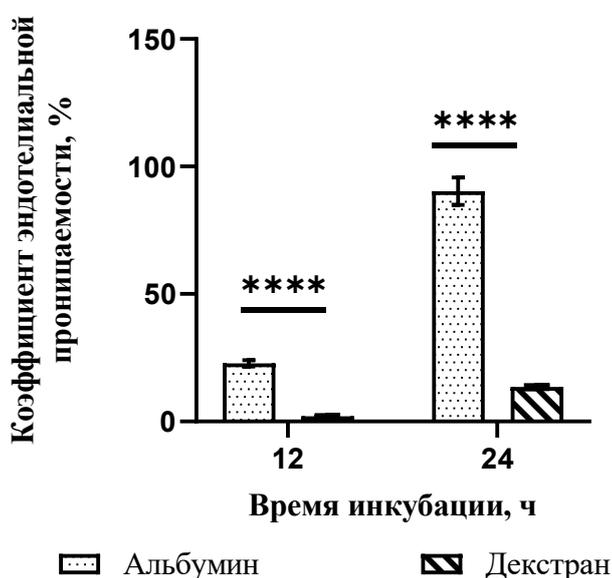


Рисунок 13. Эндотелиальная проницаемость для альбумина и декстрана 70 кДа. Коэффициент эндотелиальной проницаемости представляет собой отношение прохождения исследуемого вещества через эндотелиальный монослой к прохождению данного вещества через вставку без эндотелиальных клеток. Инкубация в течение 24 ч. $n = 10-15$

**** – $p < 0,0001$

3.2. Исследование механизмов трансэндотелиального транспорта белка и липопротеинов плазмы крови

3.2.1. Влияние убаина на трансэндотелиальный транспорт

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 [225, 227, 242]. Полученные результаты (Рисунок 14) свидетельствуют о том, что количество всех тестируемых веществ, прошедших через монослой эндотелиальных клеток, увеличивается во времени (двухфакторный дисперсионный анализ: для альбумина $F(1, 6) = 386,6$ $P < 0,0001$; апо А-1 $F(1, 6) = 102,4$ $P < 0,0001$; IgM $F(1, 6) = 19,26$ $P = 0,0046$), а убаин снижает трансэндотелиальный транспорт апо А-1 (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 6) = 400,2$ $P < 0,0001$), альбумина (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 6) = 131,9$ $P < 0,0001$) и IgM (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 6) = 31,83$ $P = 0,0013$) по сравнению с контролем. Таким образом, ингибитор Na^+/K^+ -АТФазы убаин снижает трансэндотелиальный транспорт белков, это указывает на то, что активный энергозависимый кавеолиновый трансцитоз указанных белков вносит существенный вклад в их транспорт через монослой эндотелиальных клеток EA.hy926 *in vitro*.

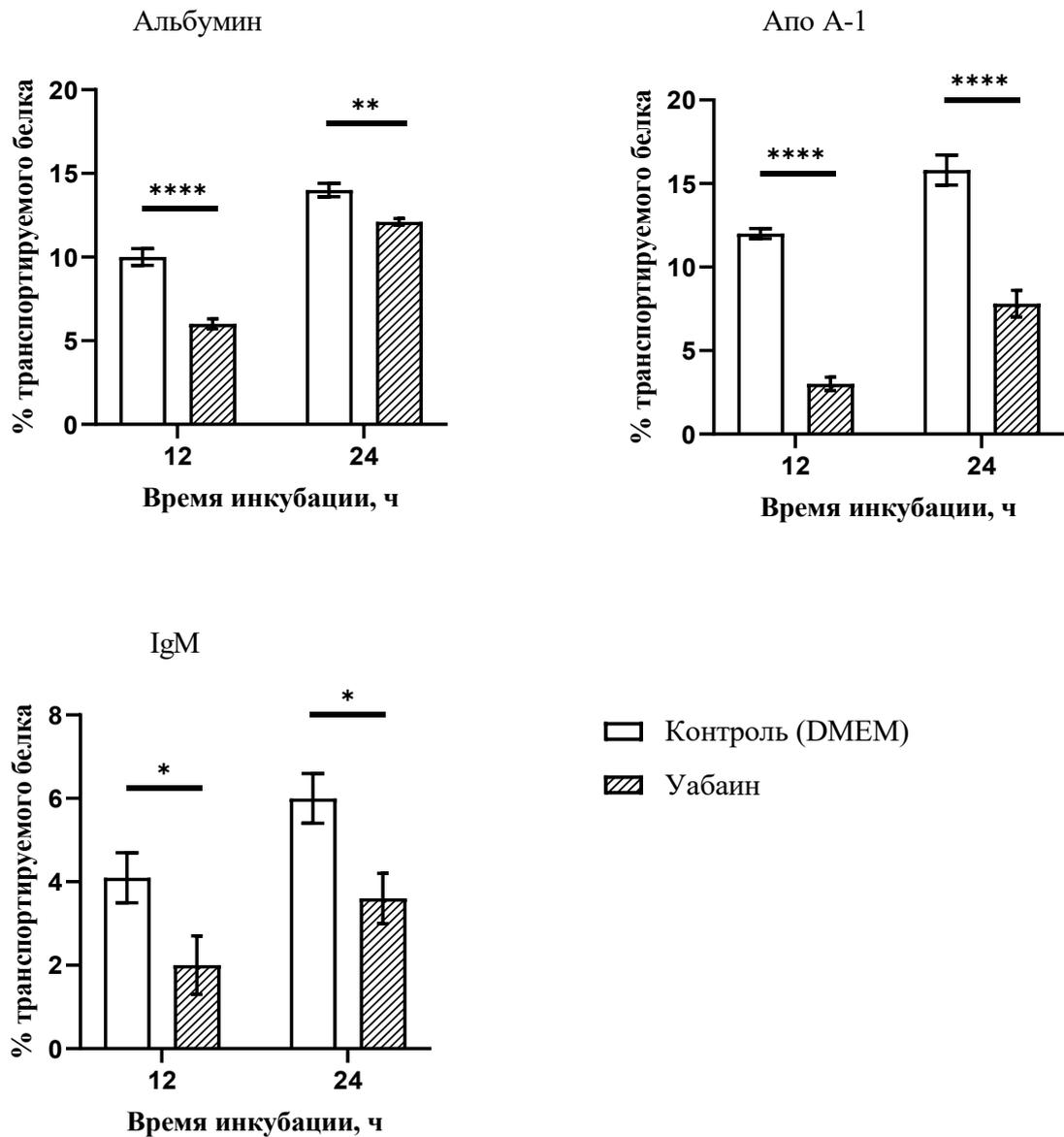


Рисунок 14. Влияние убаина на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных белков и липопротеинов плазмы крови в верхнюю камеру). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 15-20). Двухфакторный дисперсионный анализ. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$.

3.2.2. Влияние амиазина на трансэндотелиальный транспорт белков

Амиазин (хлорпромазин) - вещество, являющееся блокатором сборки клатриновых «корзинок», которые требуются для трансцеллюлярного переноса молекул. Хлорпромазин - катионный амфипатический препарат, который транслоцирует клатрин с поверхности клетки к внутриклеточным эндосомам, истощая поверхностную мембрану, что приводит к блокированию клатрин-

опосредованного эндоцитоза [228, 229]. Транспорт альбумина и апо В по нашим данным при воздействии аминазина снижался по сравнению с контролем (Рисунок 15. t-критерий Стьюдента: для альбумина $t=6,745$ $p=0,0025$; для апо В $t=0,9357$ $p=0,4024$). Эти данные свидетельствует о том, что трансцеллюлярный транспорт вносит существенный вклад в прохождении ЛПНП и, особенно, альбумина через эндотелиальный монослой.

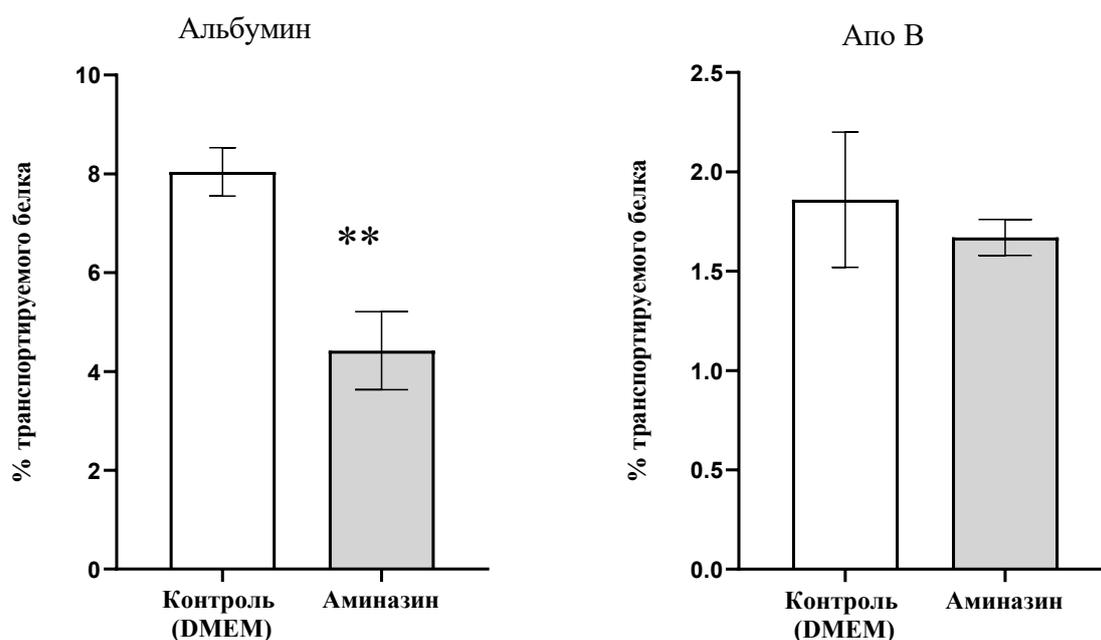


Рисунок 15. Влияние аминазина на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных белков и липопротеинов плазмы крови в верхнюю камеру). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 15-20$). ** – $p < 0,01$. по сравнению с группой контроля, t-критерий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

3.2.3. Захват эндотелиоцитами линии EA.hy926 меченых макромолекул через 1 ч инкубации.

Эндоцитоз, процесс посредством которого клетки интернализуют макромолекулы и поверхностные белки, впервые был обнаружен с развитием электронной микроскопии, которая позволила визуализировать

специализированные мембранные домены, ответственные за два морфологически различных пути: клатрин- и кавеолин-опосредованный эндоцитоз [230].

При рецептор-опосредованном эндоцитозе ключевую роль 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 "корзинок" [231].

Рецептор-независимый эндоцитоз обеспечивается участием кавеолина. Кавеолин-1 представляет собой интегральный белок плазмалеммы с центральным гидрофобным доменом, формирующим петлю. Кавеолин-1 – является основным белком кавеол, он образует «скелет» кавеолы вместе с другими формами кавеолина [232]. «Скелет» же определяет форму кавеол, размеры и многие их свойства. Кавеолы проявляют стабильность и долго существуют в мембране, кавеолы – исключительно долгоживущие белки. Известно, что в отличие от «клатриновых» пузырьков, кавеолы не сбрасывают свое кавеолиновое «покрытие» при попадании в цитоплазму.

Для выяснения роли клатрина и кавеолина в трансэндотелиальном транспорте различных веществ мы прибегли к методу конфокальной микроскопии (Рисунок 16).

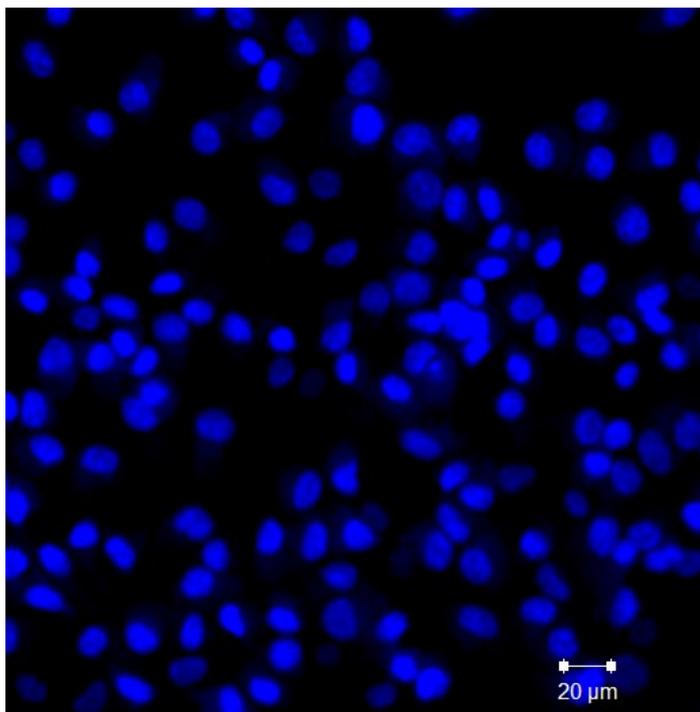


Рисунок 16. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926 (конфокальная микроскопия, объектив 20X). Синий цвет – меченые интеркалирующим флуоресцентным красителем DAPI ядра клеток. Инкубация от момента посева клеток 72 ч.

При помощи конфокальной микроскопии мы наблюдали захват белковых молекул эндотелиальными клетками EA.hy926. В течение 1 часа инкубации клетки интенсивно захватывали меченые альбумин и ЛПНП (Рисунок 17 А, В). На микрофотографиях чётко видны ядра эндотелиальных клеток и очаговое накопление исследуемых белковых молекул в цитоплазме, по-видимому, в эндоцитозных везикулах. Захват макромолекул усиливался со временем, через 2 и 24 часа транспорт ЛПНП составлял 0,5% и 6% соответственно, альбумина 1,5% и 2,2%. Добавление в верхнюю камеру к клеткам аминазина приводило к уменьшению захвата ЛПНП и альбумина. Таким образом, аминазин блокировал захват молекул эндотелиальными клетками (Рисунок 17 Б, Г), что позволяет говорить о клатрин-зависимом эндоцитозе как о возможном механизме транспорта молекул в эндотелиальных клетках нашей модели.

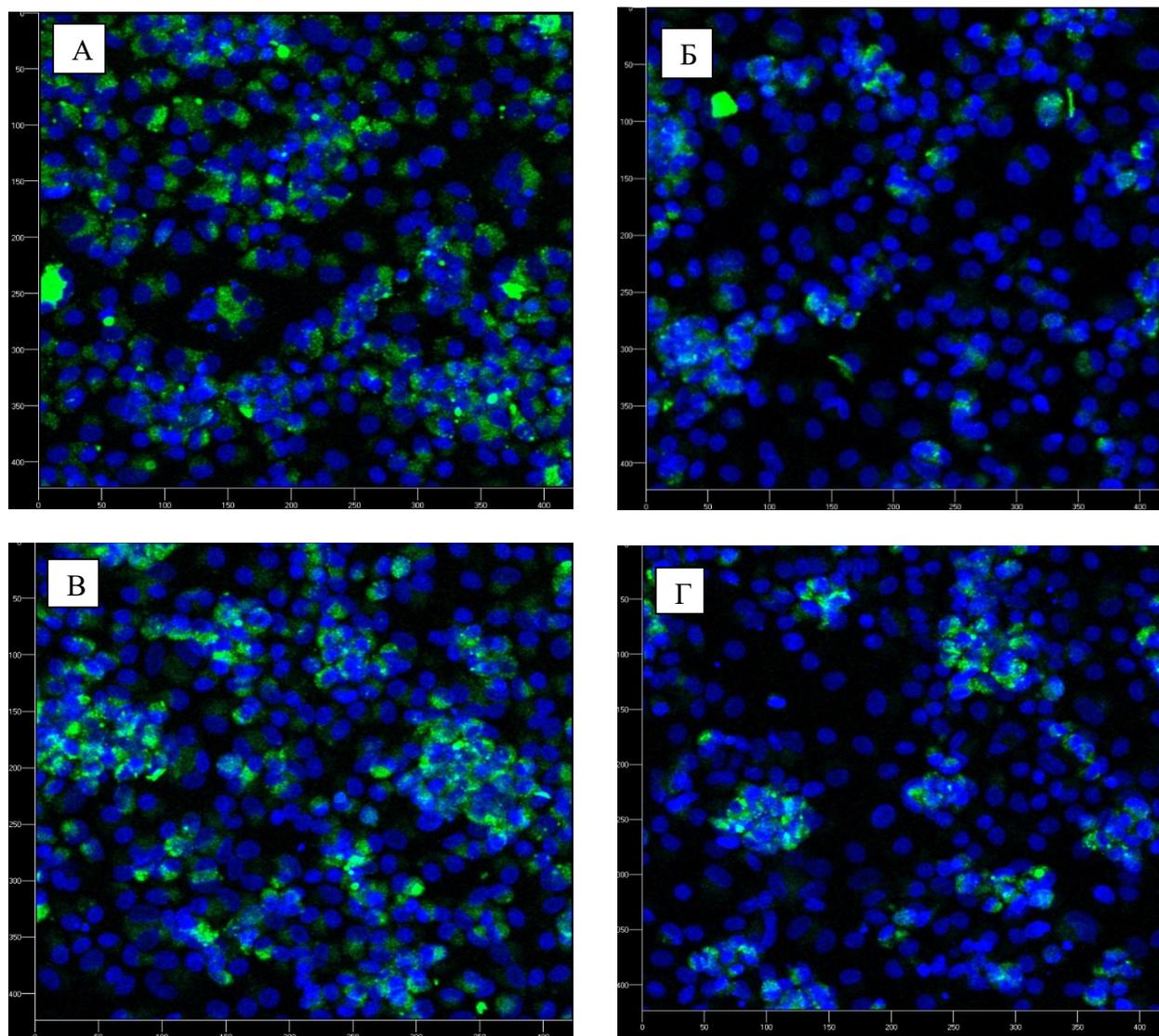


Рисунок 17. Захват эндотелиоцитами линии EA.hy926 меченых макромолекул (ЛПНП, альбумин) через 1 ч инкубации (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, объектив 20X). Синий цвет – меченые DAPI ядра клеток, зелёный – меченые FITC макромолекулы. В отсутствие и присутствии ингибиторов транспорта.

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

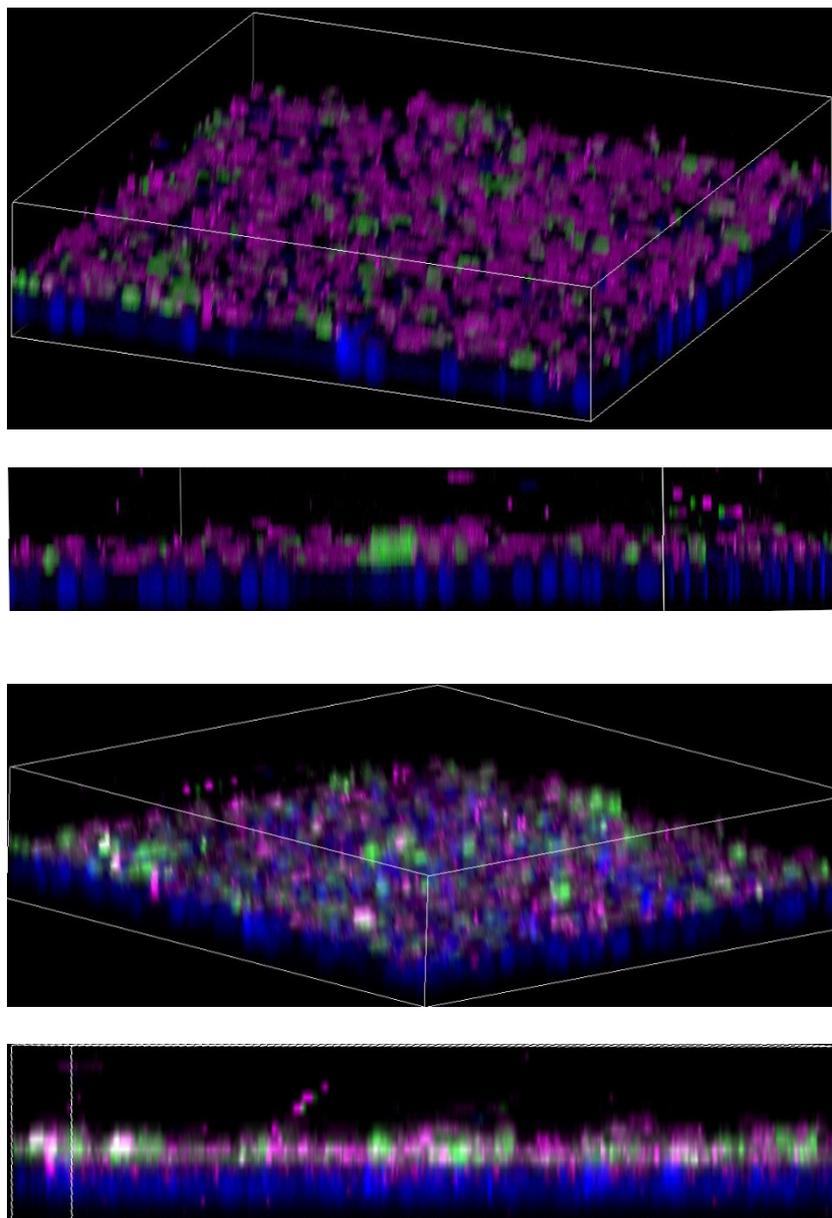


Рисунок 18. Захват эндотелиоцитами линии EA.hy926 меченых макромолекул через 24 ч инкубации (3D-реконструкция поэтапных срезов исследуемого монослоя, сагиттальный срез, конфокальная микроскопия, объектив 20X). Синий цвет – меченые DAPI ядра, зелёный – FITC-декстран, розовый – Cu5-ЛПНП (50 мкг/мл). Сходные данные были получены и для Cu5-альбумина.

На представленных рисунках (Рисунок 18) клетки активно захватывают ЛПНП и альбумин. Об этом свидетельствует гранулярная структура меченых образований (эндоцитозные пузырьки), а также особое расположение меченых образований, они сконцентрированы вокруг ядер. В данном случае можно исключить эффект простого налипания белковых молекул на клетки, так как мы не наблюдали бы выше описанной закономерности. Специфические области

налипания также обнаружены, это можно объяснить тем, что скорее всего это белковые комплексы, которым не удалось проникнуть внутрь клеток эндотелиального монослоя.

Полученные данные свидетельствуют, что аминазин снижает интенсивность захвата ЛПНП.

Следует отметить, что лишь небольшая часть метки доходит до самих ядер клеток, что согласуется с низкой скоростью транспорта макромолекул через эндотелий.

3.2.4. Использование метода проточной цитофлуориметрии для количественной оценки захвата меченых макромолекул эндотелиоцитами человека линии EA.hy926

Для подтверждения полученных данных конфокальной микроскопии о захвате меченых макромолекул эндотелиальными клетками, а также для оценки действия ингибиторов на этот захват мы использовали метод проточной цитофлуориметрии. Эндотелиальные клетки EA.hy926 инкубировали с мечеными ЛПНП с или без ингибиторов различных путей эндоцитоза. Полученные результаты представлены на рисунке 19, показатель средней флуоресценции флуорохрома Cy5 отражает количество ЛПНП, поглощённых эндотелиоцитами в присутствии ингибиторов и без них (контроль). Аминазин достоверно снижал захват меченых ЛПНП по сравнению с контролем, аналогичный эффект наблюдался при воздействии метициклодекстрина. Полученные результаты для наглядности представлены в виде гистограмм на рисунке 20.

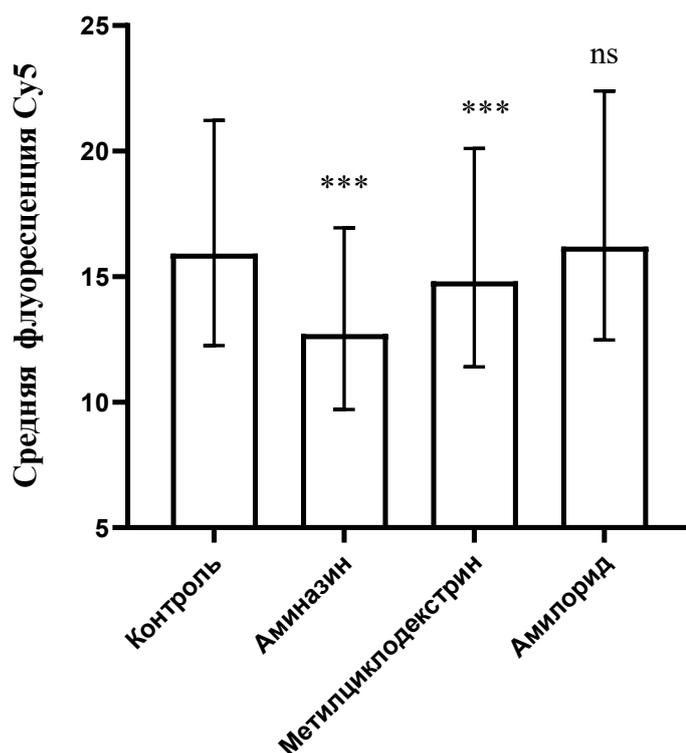


Рисунок 19. Влияние ингибиторов различных путей эндоцитоза на захват ЛПНП, меченых флуорохромом Cu5, эндотелиальными клетками EA.hy926 (обозначены медиана и квартили, а также отличия от контрольной группы по апостериорному критерию Данна, *** $p < 0,001$, ns – недостоверно).

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, 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 19). Таким образом, можно предположить, что транспорт ЛПНП происходит путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием клатринового и кавеолинового механизмов.

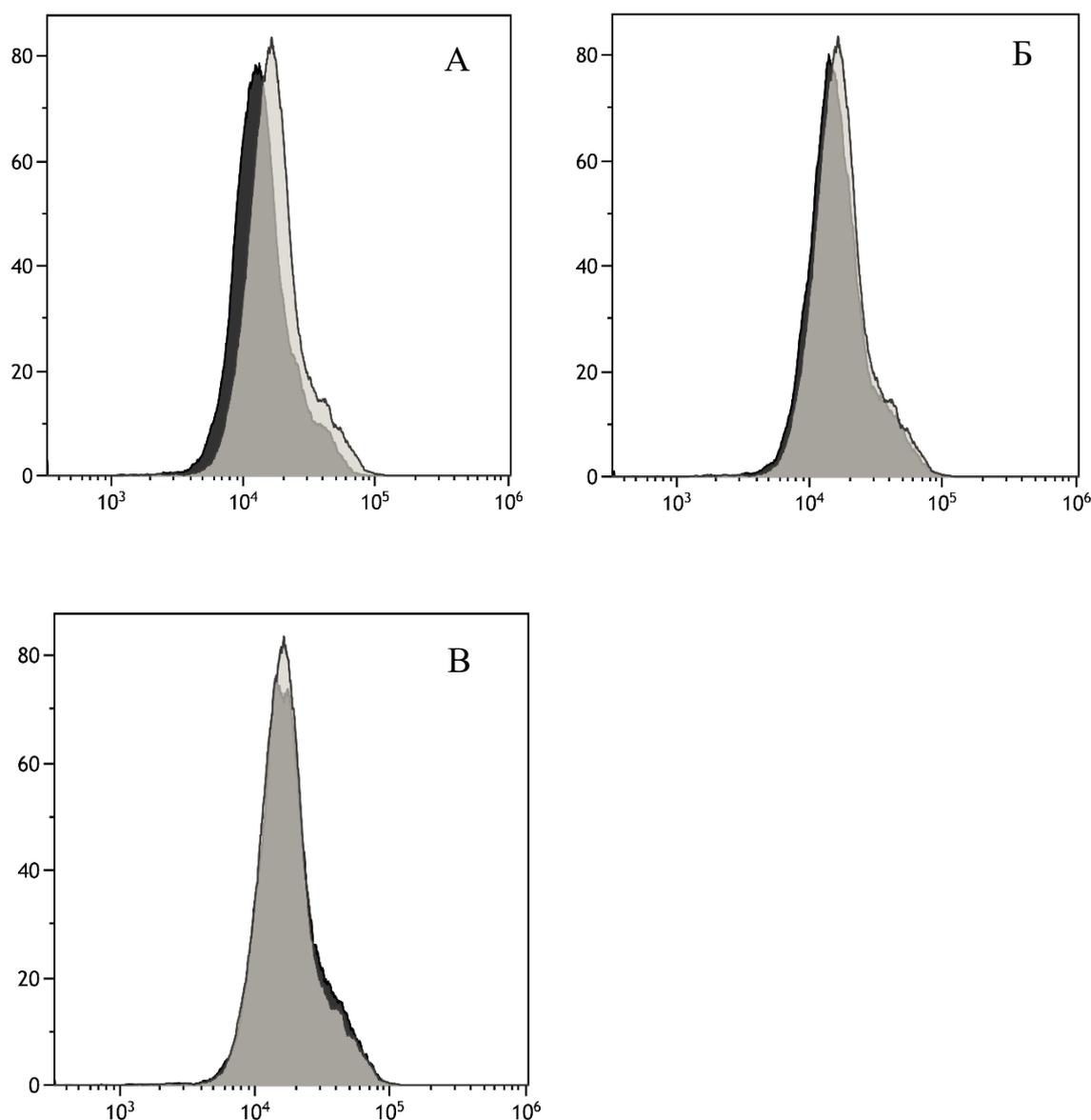


Рисунок 20. Влияние ингибиторов эндоцитоза на захват ЛПНП, меченых флуорохромом Су5, эндотелиальными клетками EA.hy926 в сравнении с контролем. По оси абсцисс: Экспрессия антигена. По оси ординат: Относительное содержание клеток. Обозначение пиков: светлый цвет – контроль, тёмный цвет – соответствующий ингибитор. Гистограммы интенсивности флуоресценции Су5, под действием ингибиторов: а) аминазин, б) метилциклодекстрин, в) амилорид.

3.2.5. Изучение колокализации меченых ЛПНП с кавеолином в клетках EA.hy926

С помощью конфокального микроскопа были получены изображения, на которых можно увидеть ядра эндотелиальных клеток, кавеолин находящийся в клетках и добавленные к клеткам меченные ЛПНП (Рисунок 21). Синим цветом показаны ядра эндотелиоцитов, зелёным цветом - кавеолин, а точнее нами

использованный холерный токсин (меченый красителем FITC), который отчасти захватывается кавеолами, красным цветом - ЛПНП, меченые красителем ROX. На рисунке 21 А представлено 3D изображение эндотелиального монослоя, где можно видеть присутствие всех вышеописанных компонентов по цветам.

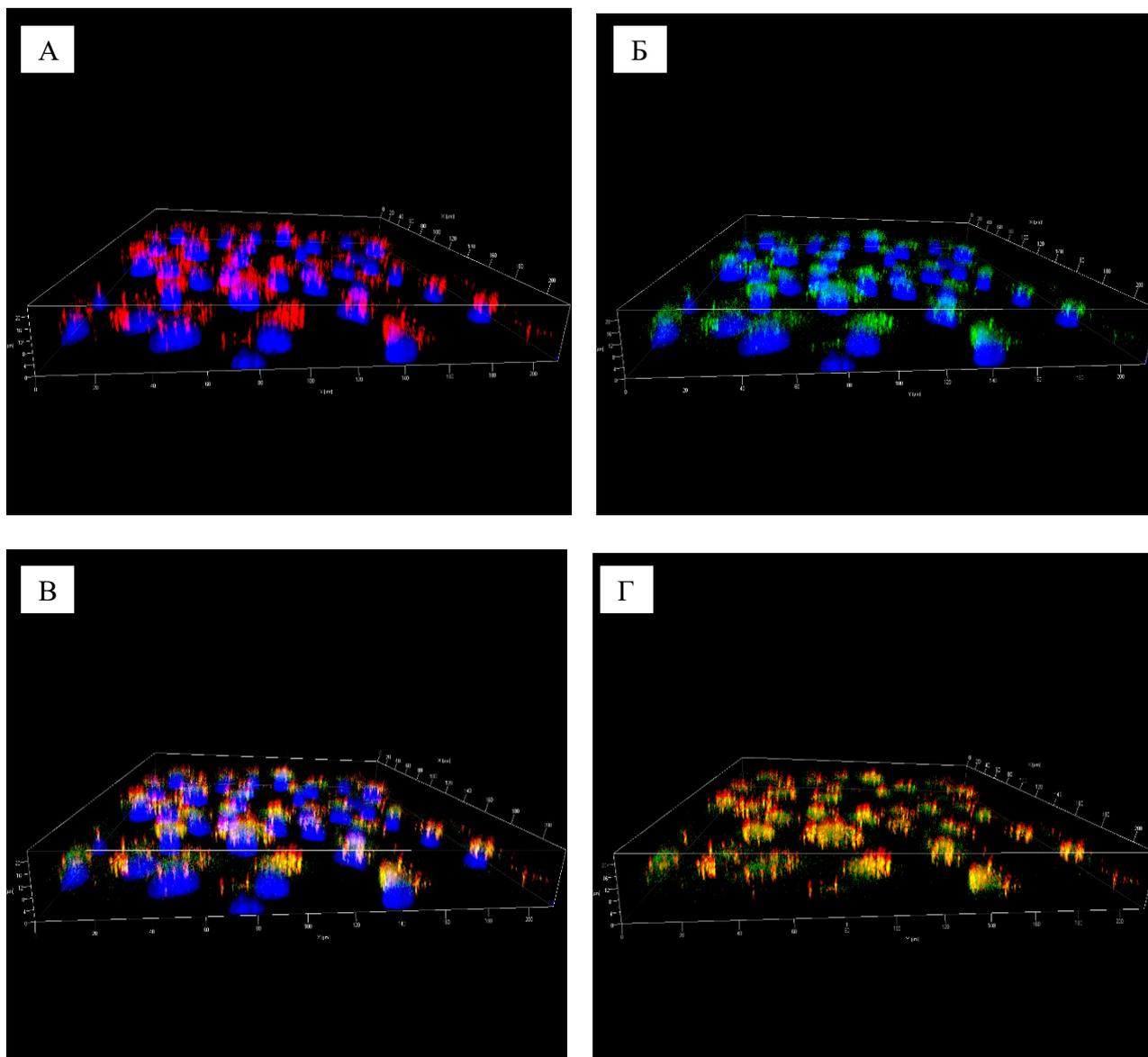


Рисунок 21. Конфокальная микроскопия (объектив 20X). Изучение колокализации меченых ЛПНП с кавеוליном в эндотелиальных клетках EA.hy926. 3D изображение эндотелиального монослоя (синий цвет – меченые DAPI ядра): а) ЛПНП меченые ROX (красный цвет), б) кавеолин-1 (холерный токсин, меченый красителем FITC) (зелёный цвет), в) наложение двух меток ЛПНП и кавеолин-1 соответственно, г) наложение двух меток ЛПНП и кавеолин-1 соответственно, без детекции ядер.

Таким образом, опираясь на представленные данные конфокальной микроскопии, следует отметить, что меченые ЛПНП колокализуются с кавеолином в эндотелиальных клетках EA.hy926.

3.3. Влияние основных факторов воспаления на трансэндотелиальный транспорт

Одним из основных патогенетических событий при атеросклерозе является развитие воспаления в ответ на накопление и модификацию апо В-содержащих липопротеинов. 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 на нашей модели влияние некоторых факторов воспаления на прохождение плазменных белков, в частности ЛПНП, через эндотелиальный монослой *in vitro*. Факторы воспаления исследованные на данной модели: гистамин, TNF α , С-реактивный белок, ЛПС (липополисахарид, эндотоксин). Кроме того, в некоторых экспериментах в качестве источника различных факторов воспаления выступали тучные клетки (активированные и не активированные).

В связи с тем, что некоторые факторы воспаления могут обладать цитотоксичностью, прежде всего была изучена способность изучаемых агентов индуцировать апоптоз эндотелиальных клеток в тех условиях, в которых впоследствии проводилась оценка их влияния на трансэндотелиальный транспорт плазменных белков. Апоптоз оценивали с помощью двух независимых методов на проточном цитофлуориметре Navios (Becton Coulter). Оба метода показали сходные результаты, которые представлены в таблицах 5 и 6. Как видно из представленных результатов, инкубация в течение 2-24 часов эндотелиальных клеток с гистамином, TNF α , С-реактивным белком не приводила к повышению количества погибших клеток, по сравнению с инкубацией без этих веществ. В качестве положительного контроля был использован камптотецин (СAM 10 мкМ;

Sigma-Aldrich, США), цитотоксический хинолиновый алкалоид, ингибирующий топоизомеразу I, ядерный фермент, участвующий в процессе репликации ДНК. Камптотецин ковалентно связывается с топоизомеразой I и ДНК, образуя тройной комплекс, что является причиной повреждения ДНК, ведущее к апоптозу клетки. Камптотецин в наших экспериментах после 24 часов инкубации также индуцировал гибель более 20% эндотелиальных клеток – примерно в 4 раза больше, чем в контроле.

Таблица 5: Влияние факторов воспаления на частоту апоптоза эндотелиальных клеток EA.hy926. Метод 1: смесь PI (пропидиум иодид, окрашивает ДНК) и YO-PRO-1 (карбоцианин иодид, проникает только в клетки с нарушенной проницаемостью мембраны). n = 20-25

**** – p < 0,0001

Воздействующее в-во на эндотелиальные клетки	Живые клетки, %		Ранний апоптоз, %		Поздний апоптоз, %	
	2ч	24ч	2ч	24ч	2ч	24ч
Контроль (энд.кл.)	95,1 ± 4,89	93,95 ± 4,83	3,45 ± 2,33	5,3 ± 2,42	1,45 ± 0,23	0,75 ± 0,2
ЛПНП, альбумин	93,15 ± 6,66	92,75 ± 6,63	4,95 ± 2,51	5,85 ± 2,57	1,9 ± 0,29	1,4 ± 0,26
ЛПНП, альбумин, гистамин (10 ⁻⁶ М)	94 ± 3,9	95,9 ± 3,97	4,6 ± 2,34	3,4 ± 2,3	1,4 ± 0,22	0,7 ± 0,19
ЛПНП, альбумин, гистамин (10 ⁻⁶ М) +Н ₁ блок.	93,4 ± 7,61	93 ± 7,58	4,4 ± 2,51	5,6 ± 2,61	2,2 ± 0,34	1,4 ± 0,27
ЛПНП, альбумин, CRP (200мкг/мл)	94,4 ± 7,69	93,1 ± 7,58	4,5 ± 2,52	5,5 ± 2,6	1,1 ± 0,25	1,4 ± 0,27
Камптотецин (в-во, вызыв. апоптоз)	93,4 ± 4,81	67,91 ± 3,54 ****	5,2 ± 2,42	21,49 ± 3,23 ****	1,4 ± 0,23	10,6 ± 0,69 ****
ЛПНП, альбумин, TNFα (50 нг/мл)	92,9 ± 5,71	94,3 ± 5,79	5,2 ± 2,47	4,6 ± 2,43	1,9 ± 0,27	1,1 ± 0,23

Таблица 6: Влияние факторов воспаления на частоту апоптоза эндотелиальных клеток EA.hy926. Метод 2: смесь DRAQ7 (окрашивает ДНК в мертв. клетках) и TMRM (репортер потенциала внутренней мембраны митохондрий, окрашивает только живые клетки). n = 20-25

**** – p < 0,0001

Воздействующее в-во на эндотелиальные клетки	Живые клетки, %		Ранний апоптоз, %		Поздний апоптоз, %	
	2ч	24ч	2ч	24ч	2ч	24ч
Контроль (энд.кл.)	94,5 ± 4,81	90,8 ± 4,68	3,5 ± 2,33	6,4 ± 3,48	1,95 ± 1,66	2,75 ± 2,3
ЛПНП, альбумин	93,6 ± 6,69	90,9 ± 6,5	3,2 ± 2,38	7,05 ± 3,65	3,1 ± 2,78	2 ± 1,76
ЛПНП, альбумин, гистамин (10 ⁻⁶ М)	93,2 ± 4,86	93,8 ± 3,89	4,6 ± 2,34	4,8 ± 2,35	2,2 ± 1,25	1,4 ± 1,12
ЛПНП, альбумин, гистамин (10 ⁻⁶ М) +Н ₁ блок.	95,4 ± 6,77	85,4 ± 9,97	3,1 ± 2,41	7,1 ± 3,73	1,5 ± 1,08	7,5 ± 5,76 ****
ЛПНП, альбумин, CRP (200мкг/мл)	95 ± 7,73	90,3 ± 7,36	2,9 ± 2,39	7,2 ± 3,73	2,1 ± 1,33	2,5 ± 2,06
Камптотецин (в-во, вызыв. апоптоз)	93,2 ± 4,8	61 ± 5,19 ****	3,3 ± 2,32	28,3 ± 7,57 ****	3,5 ± 2,63	10,7 ± 4,69 ****
ЛПНП, альбумин, TNFα (50 нг/мл)	95,5 ± 5,86	92,6 ± 5,69	2,9 ± 2,33	5,6 ± 2,49	1,6 ± 1,06	1,8 ± 1,27

Из этих данных следует, что изменение скорости трансэндотелиального транспорта белковых молекул, в частности ЛПНП, в присутствии указанных веществ не будет результатом гибели клеток и нарушения целостности эндотелиального монослоя.

3.3.1. Влияние фактора острой фазы воспаления С-реактивного белка (CRP) на трансэндотелиальный транспорт белков и липопротеинов плазмы крови человека

Известно, что содержание С-реактивного белка (системного фактора воспаления) увеличивается на порядок при воспалительных реакциях.

На эндотелиальный монослой воздействовали СРБ в разных концентрациях, наибольший эффект СРБ мы наблюдали в концентрации 200 мкг/мл (концентрация

не является токсичной для клеток, что было проверено ранее методом проточной цитофлуориметрии).

Оказалось, что CRP, добавленный в верхнюю камеру системы, активировал трансэндотелиальный транспорт альбумина и IgM, причем различия выявлялись только после 24 часов инкубации (Рисунок 22). В то же время, трансэндотелиальный транспорт ЛПНП и апо А-1 увеличивался под влиянием CRP через 12 и 24 ч инкубации.

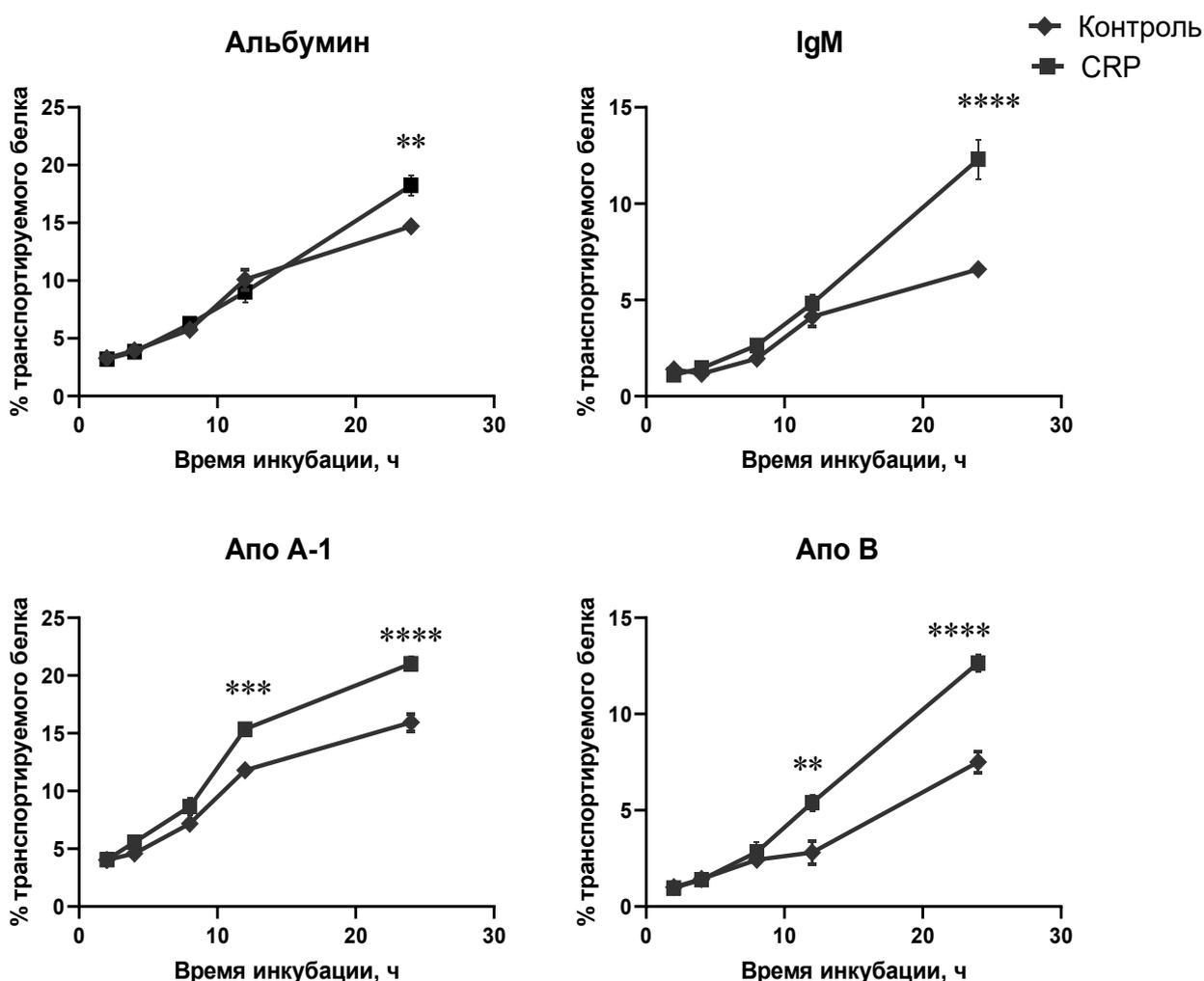


Рисунок 22. Влияние С-реактивного белка (CRP) на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных белков и липопротеинов плазмы крови в верхнюю камеру). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 20-25). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$. Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Шидака.

Таким образом, CRP в концентрации 200 мкг/мл, соответствующей его уровню в крови в острой фазе воспаления, стимулирует трансэндотелиальный транспорт ЛПНП и ЛПВП уже после 12 ч инкубации.

3.3.2. Влияние фактора некроза опухолей альфа (TNF α) на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП плазмы крови человека

TNF α является одним из самых активных провоспалительных цитокинов, продукция которого увеличивается уже на самых ранних стадиях воспаления, в том числе и в артериальной стенке при атерогенезе [234]. Для подтверждения данных о провоспалительном эффекте TNF α на использованной в настоящем исследовании было проведено ряд предварительных экспериментов.

Предварительная оценка препарата TNF α на отсутствие токсичности и способность вызывать характерные реакции эндотелиальных клеток (экспрессию молекулы адгезии ICAM-1/CD54)

Прежде всего, при помощи метода проточной цитофлуориметрии была оценена токсичность TNF α по отношению к эндотелиальным клеткам EA.hy926. Результаты показали, что TNF α можно использовать в данной модели, так как токсический эффект на клетки минимален по сравнению с контролем (Таблицы 5 и 6). В качестве контроля выступали эндотелиальные клетки, без воздействия TNF α .

Кроме того, эндотелиальные клетки EA.hy926 были проверены на способность отвечать на TNF α повышением экспрессии молекул клеточной адгезии. Как видно из результатов, представленных в Таблице 7, в образцах с добавлением к эндотелиальному монослою TNF α (50 нг/мл) отмечается отчетливое повышение экспрессии маркера CD54 по сравнению с контролем, что говорит об эффективности используемого препарата TNF α и его способности вызывать адекватные реакции эндотелия.

Таблица 7. Оценка уровня экспрессии CD54 на поверхности эндотелиальных клеток под действием TNF α (инкубация 24 ч) (обозначено среднее квадратичное отклонение, а также отличие действия TNF α от контрольной группы по апостериорному критерию Даннета, $n = 15-20$, **** $p < 0,0001$).

Воздействующее в-во на эндотелиальные клетки	Средняя флуоресценция CD54 FITC
Энд. кл. + DMEM (контроль)	1,43 \pm 0,12
Энд. кл. + TNF α (50 нг/мл)	2,05 \pm 0,05 ****
Энд. кл. + IgG1 FITC (изотипический)	0,54 \pm 0,02

Влияние TNF α на трансэндотелиальный транспорт белковых молекул и липопротеинов.

Трансэндотелиальный транспорт ЛПНП достоверно усиливался под действием TNF α к 24 ч инкубации (Рисунок 23; двухфакторный дисперсионный анализ: фактор времени инкубации $F(1, 8) = 1808$, $p < 0,0001$; фактор воздействия $F(1, 8) = 140,9$, $p < 0,0001$, апостериорный критерий Шидака: $t = 15,87$, $p < 0,0001$).

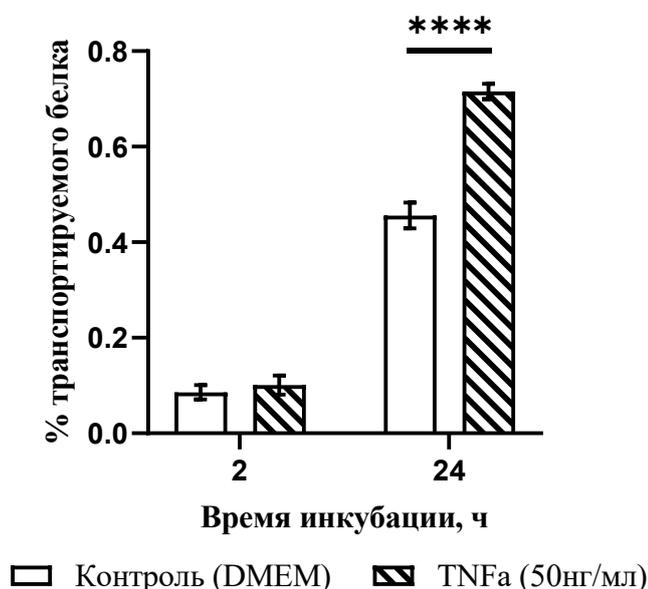


Рисунок 23. Влияние TNF α в концентрации 50 нг/мл) на транспорт ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного ЛПНП в верхнюю камеру). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 20-25$). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Шидака. ****– $p < 0,0001$

Анализ механизма действия TNF α на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП и альбумина

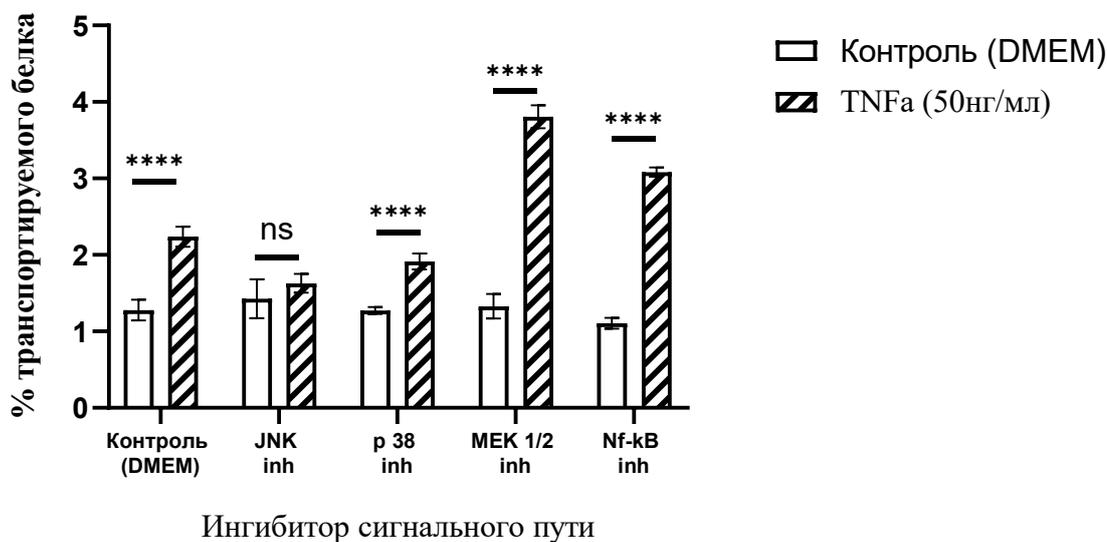


Рисунок 24. Влияние ингибиторов сигнального пути на активацию TNF α транспорта ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного ЛПНП в верхнюю камеру). Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 20-25$). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Шидака. ****_ $p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

Для выяснения механизмов влияния TNF α на трансэндотелиальный транспорт веществ были использованы ингибиторы различных внутриклеточных сигнальных путей. В результате было установлено, что только ингибитор JNK элиминировал активирующее действие TNF α на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП (Рисунок 24; апостериорный тест Шидака: $t = 1,828$, $p = 0,3496$). В то же время ингибиторы p38, Nf-kB и MEK или не предотвращали действие TNF α или даже усиливали его. Таким образом TNF α воздействует на эндотелиальный транспорт через JNK сигнальный протеинкиназный 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, как известно, характерно длительное повышение содержания в крови как TNF α , так и CRP [234].

3.3.3. Влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт белков

Увеличение сосудистой проницаемости является характерной чертой воспалительного процесса. Известно, что гистамин увеличивает проницаемость венул и вызывает образование зазоров между эндотелиальными клетками. Данный процесс протекает быстро, эффект можно наблюдать уже с первых минут инкубации [235].

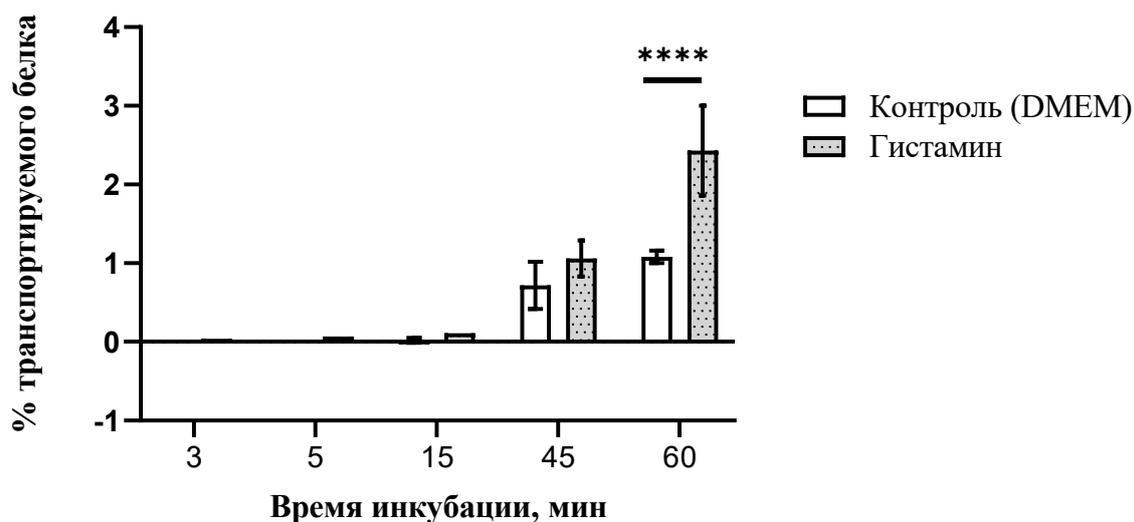


Рисунок 25. Влияние гистамина на транспорт ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного ЛПНП в верхнюю камеру). Концентрация гистамина 10^{-6} М. Инкубация в течение 60 мин. Приведены средние \pm SD (n = 15-20). Двухфакторный дисперсионный анализ в зависимости от времени инкубации, апостериорный критерий Шидака. **** – $p < 0,0001$

Мы наблюдали увеличение проницаемости эндотелиального монослоя для ЛПНП под влиянием гистамина к концу 1 часа наблюдения (Рисунок 25) (двухфакторный дисперсионный анализ в зависимости от времени инкубации: $F(4, 20) = 74,16$, $p < 0,0001$; двухфакторный дисперсионный анализ воздействия гистамина : $F(1, 20) = 22,56$, $p = 0,0001$; различия гистамина от контроля через 60 мин инкубации: апостериорный тест Шидака: $t = 7,586$, $p < 0,0001$).

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, вычисляющий изменение клеточного импеданса.

Метод был осуществлён с помощью прибора "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США) на базе ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова" Минздрава России. В режиме реального времени прибор регистрирует изменение импеданса, который зависит от протяженности контакта клеток с электродом, таким образом автоматически вычисляется клеточный индекс, отражающий состояние эндотелиального монослоя в определённый момент времени в контрольных (DMEM) и опытных (воздействие гистамина) лунках. Результаты эксперимента отражены на рисунке 26, где представлен график зависимости клеточного индекса 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.

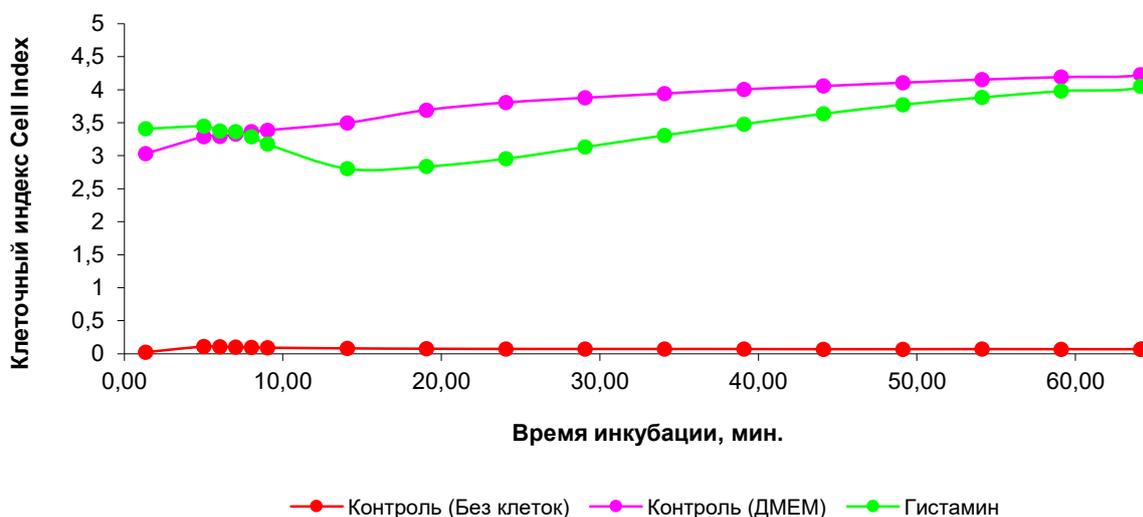


Рисунок 26. Влияние гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя при измерении клеточного биоимпеданса. Концентрация гистамина 10^{-6} М. Инкубация в течение 60 мин. $n = 15-20$. Данные представлены в виде графика с использованием программного обеспечения прибора: "Аналитическая система наблюдения за живыми клетками в режиме реального времени xCELLigence® RTCA DP" (ACEA Biosciences, Inc, США).

На более поздних инкубациях с гистамином (Рисунок 27) наблюдается понижение эндотелиальной проницаемости (по сравнению с контролем) для различных белковых молекул, таких как: альбумин (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 15) = 71,57, p < 0,0001$), IgM (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 15) = 43,29, p < 0,0001$), апо А-1 (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 15) = 78,32, p < 0,0001$), ЛПНП (двухфакторный дисперсионный анализ: $F(1, 15) = 57,52, p < 0,0001$). Видно, что характер воздействия гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя для различных молекул имеет сходства: к 24 часам инкубации наблюдается выраженное снижение транспорта по сравнению с контролем (апостериорное сравнение критерием Шидака: альбумин $t = 3,8, p = 0,008$; IgM $t = 4,4, p = 0,002$; апо А-1 $t = 4,7, p = 0,0014$; апо В $t = 6,5, p < 0,0001$), в частности более существенные для наиболее интересующего нас апо В.

Таким образом, действие гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя имеет двухфазный характер. Первая фаза – в интервале примерно 3-60 мин – характеризуется повышением проницаемости монослоя за счет увеличения межклеточных промежутков. Вторая фаза – 1-24 часа – характеризуется повышением трансэндотелиального транспорта белковых молекул и липопротеинов (Рисунок 27).

Возможно, что гистамин повышает проницаемость эндотелиального монослоя для белков сразу после воздействия на клетки, а затем происходит компенсаторное снижение проницаемости, что мы и наблюдали. То есть, возможно, это снижения проницаемости эндотелия под влиянием гистамина на поздних сроках наблюдения является не прямым эффектом гистамина, а вторичная реакция эндотелиальных клеток в ответ на исходное повышение их проницаемости для белков.

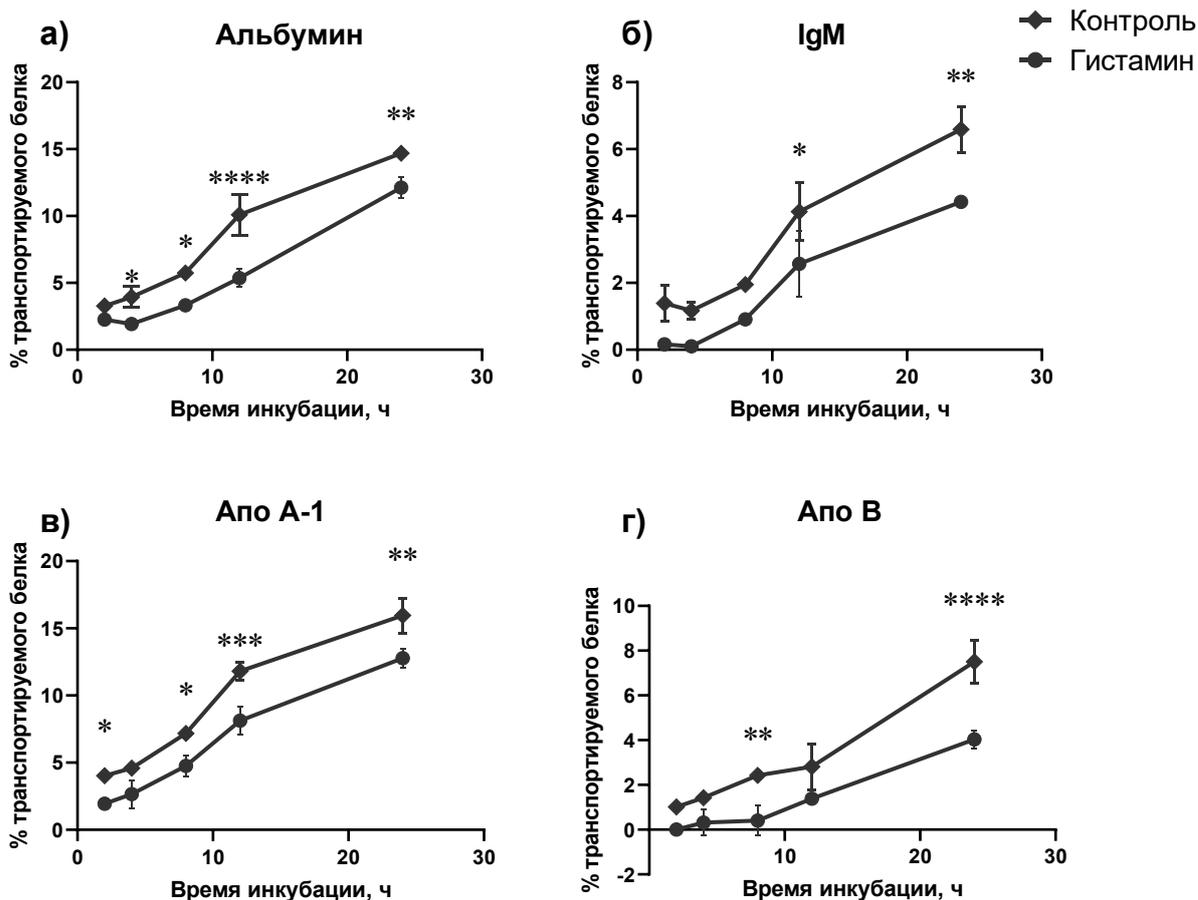


Рисунок 27. Влияние гистамина на транспорт белков и липопротеинов плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных белков и липопротеинов плазмы крови в верхнюю камеру). Концентрация гистамина 10^{-6} М. Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD ($n = 20-25$). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$. Двухфакторный дисперсионный анализ различия по сравнению с контролем, апостериорный критерий Шидака.
а) Альбумин; б) IgM; в) Апо А -1; г) Апо В

3.3.4. Влияние гистамина на транспорт веществ при блокаде Н1 и Н2 гистаминовых рецепторов эндотелия.

Гистамин оказывает своё действие, связываясь с гистаминовыми рецепторами Н1 и Н2, которые имеются на поверхности мембран эндотелиальных клеток. Существуют ингибиторы гистаминовых рецепторов, такие как супрастин - ингибитор Н1 и квамател - ингибитор Н2.

Из рисунка 28 видно, что через 24 ч инкубации транспорт апо В-содержащих липопротеинов через эндотелиальный монослой существенно падал под действием

гистамина. При добавлении в инкубационную среду ингибиторов H1 гистаминовых рецепторов происходит отмена действия гистамина на проницаемость эндотелия для ЛПНП, в то время как ингибитор H2 гистаминовых рецепторов не изменял указанные эффекты гистамина (Рисунок 28).

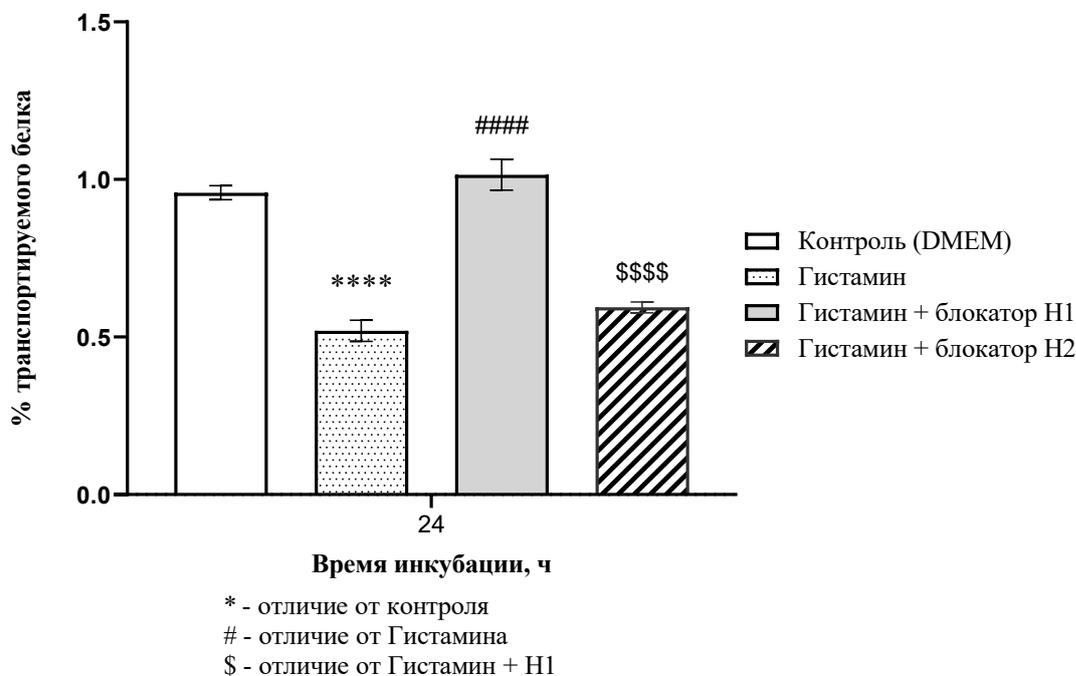


Рисунок 28. Влияние гистамина и ингибиторов H1 и H2 рецепторов на транспорт ЛПНП через эндотелиальный монослой (указан % от добавленного в верхнюю камеру). Концентрация гистамина 10^{-6} М. Супрастин и квамател использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно. Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 20-25). Однофакторный дисперсионный анализ, различия между группами апостериорный критерий Тьюки. ****, ####, \$\$\$\$ – p < 0,0001.

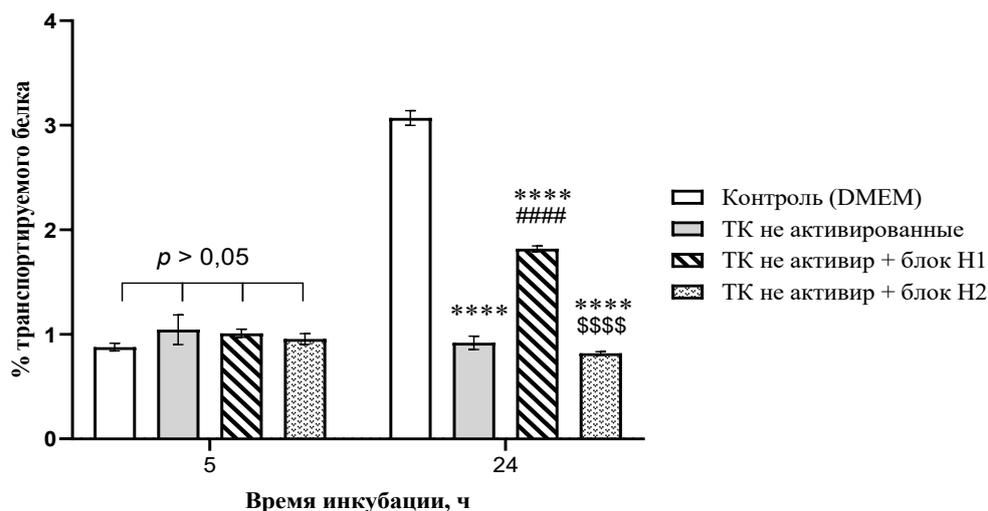
Полученные данные позволяют предполагать, что эффект гистамина на эндотелиальные клетки имеет две фазы: раннюю, продолжительностью около часа, в течение которой транспорт ЛПНП усиливается, и вторую, отсроченную, длившуюся в наших опытах до конца первых суток, когда скорость транспорта ЛПНП, наоборот, снижается ниже контрольной. Гистамин в использованной нами модели действует на эндотелиальные клетки EA.hy926 через H1 рецепторы.

3.4. Трансэндотелиальный транспорт под влиянием находящихся в нижней камере интактных и активированных тучных клеток человека НМС-1

Для оценки влияния тучных клеток на трансэндотелиальный транспорт белковых молекул и на сам эндотелиальный монослой в нижнюю камеру двухкамерной системы были помещены тучные клетки. Тучные клетки человека линии НМС-1 (количество тучных клеток соответствовало концентрации гистамина 10^{-6} М, измеренной с помощью метода Шора в супернатантах активированных клеток) помещались в нижнюю камеру предварительно активированные различными факторами или клетки без активации. В качестве активаторов применялся агрегированный иммуноглобулин IgG или вещество 48/80. Активация проводилась на холоду, чтобы избежать преждевременного выброса содержимого тучных клеток. Известно, что цитоплазма тучных клеток на 40% заполнена гранулами, содержащими вещества - медиаторы воспаления, которые могут воздействовать как на эндотелиальный монослой, так и на белковые молекулы, добавленные в верхнюю камеру рабочей модели. К примеру, химаза и триптаза могут изменить структуру ЛПНП [189]. В частности, тучные клетки выбрасывают гистамин и $\text{TNF}\alpha$, которые также были предметом исследования в нашей работе.

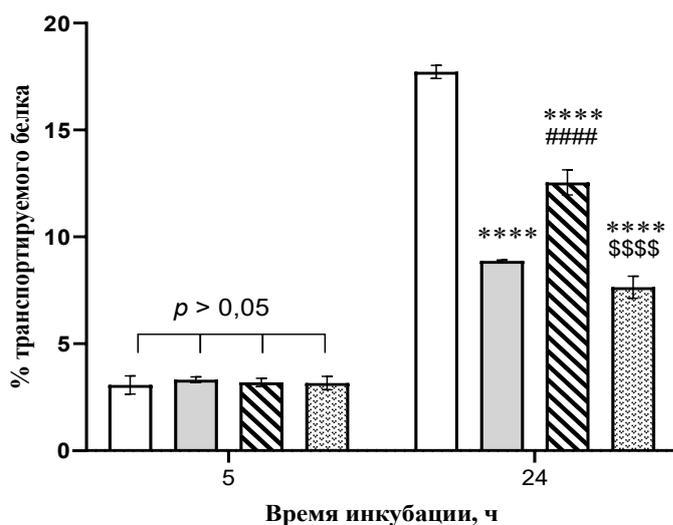
Интактные тучные клетки в разы уменьшают проницаемость эндотелия для ЛПНП к 24 часам инкубации по сравнению с контролем (без тучных клеток). Для понимания механизма воздействия тучных клеток параллельно был поставлен эксперимент в тех же условиях, но в присутствии ингибиторов гистаминовых рецепторов H1 и H2. Блокатор гистаминовых рецепторов H1 частично отменяет действие тучных клеток на трансэндотелиальный транспорт ЛПНП, тогда как блокирование H2 рецептора существенного влияния на транспорт не оказывало (Рисунок 29).

А)



* - отличие от контроля
 # - отличие от ТК не активированные
 \$ - отличие от ТК не активированные + Н1

Б)



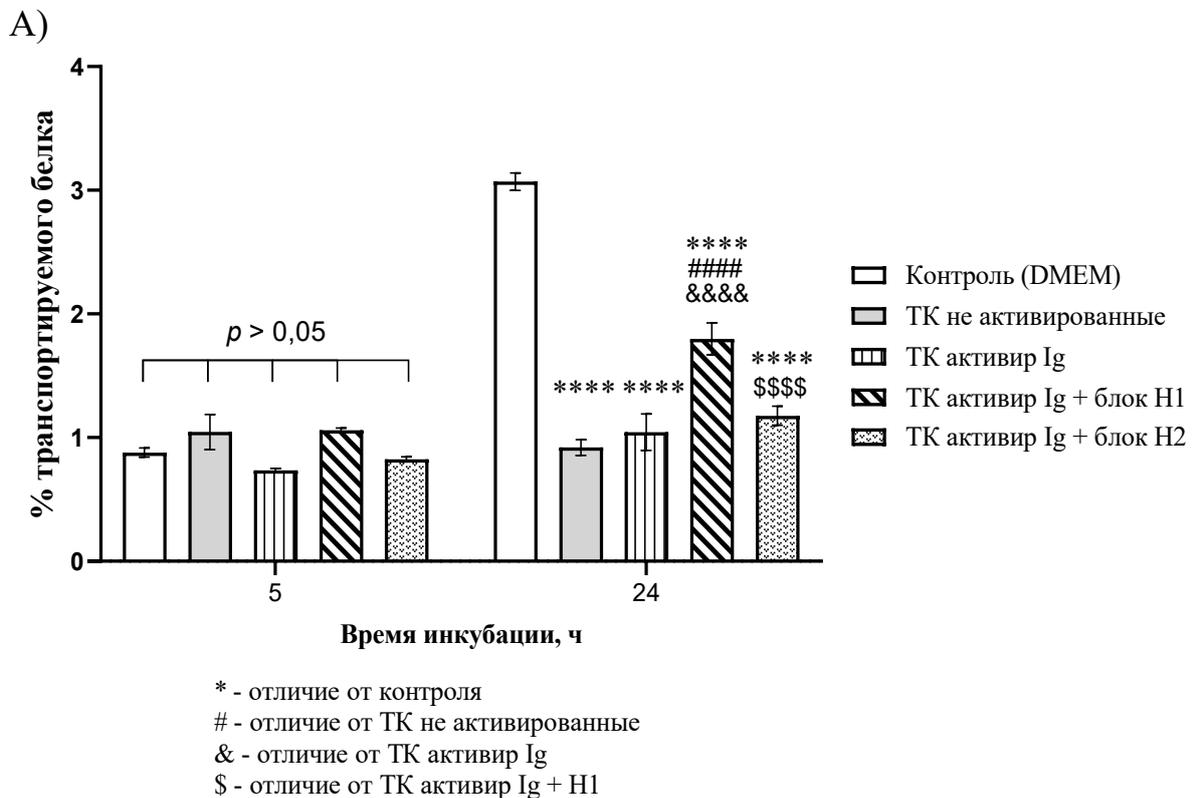
* - отличие от контроля
 # - отличие от ТК не активированные
 \$ - отличие от ТК не активированные + Н1

Рисунок 29. Влияние находящихся в нижней камере интактных ТК человека НМС-1 на транспорт альбумина и ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного в верхнюю камеру белка) и его зависимость от гистаминовых рецепторов Н1 и Н2. Супрастин и квамател использовали в качестве блокаторов Н1- и Н2-рецепторов соответственно. Инкубация в течение 24 ч. Приведены средние \pm SD (n = 20-25). Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки. ****, #####, \$\$\$\$ – $p < 0,0001$

а) ЛПНП,

б) альбумин.

Тучные клетки, активированные агрегированным иммуноглобулином IgG, также уменьшают проницаемость эндотелиального монослоя для альбумина и ЛПНП после 24 часов совместной инкубации, как и тучные клетки без предварительной активации. В первые 5 часов инкубации и предварительно активированные, и интактные тучные клетками не оказывали существенного влияния на трансэндотелиальный транспорт альбумина и ЛПНП. Как и в случае с неактивированными тучными клетками, блокатор H1 гистаминового рецептора (супрастин) существенно уменьшал ингибирование трансэндотелиального транспорта тестируемых молекул, а блокатор H2 рецептора не изменял эффект тучных клеток (Рисунок 30).



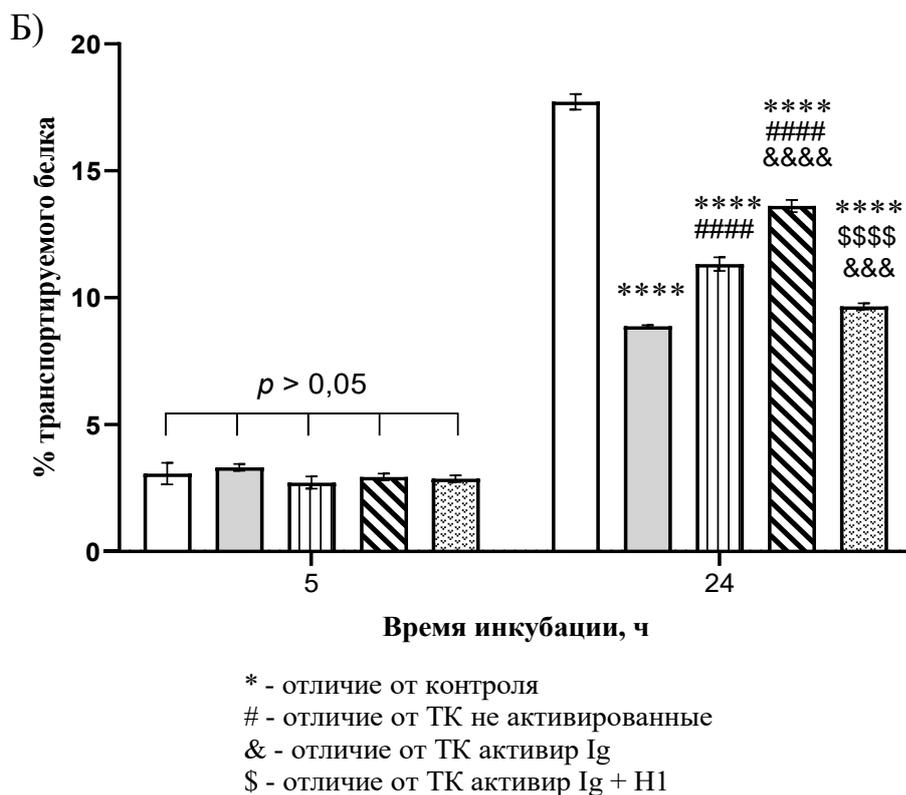
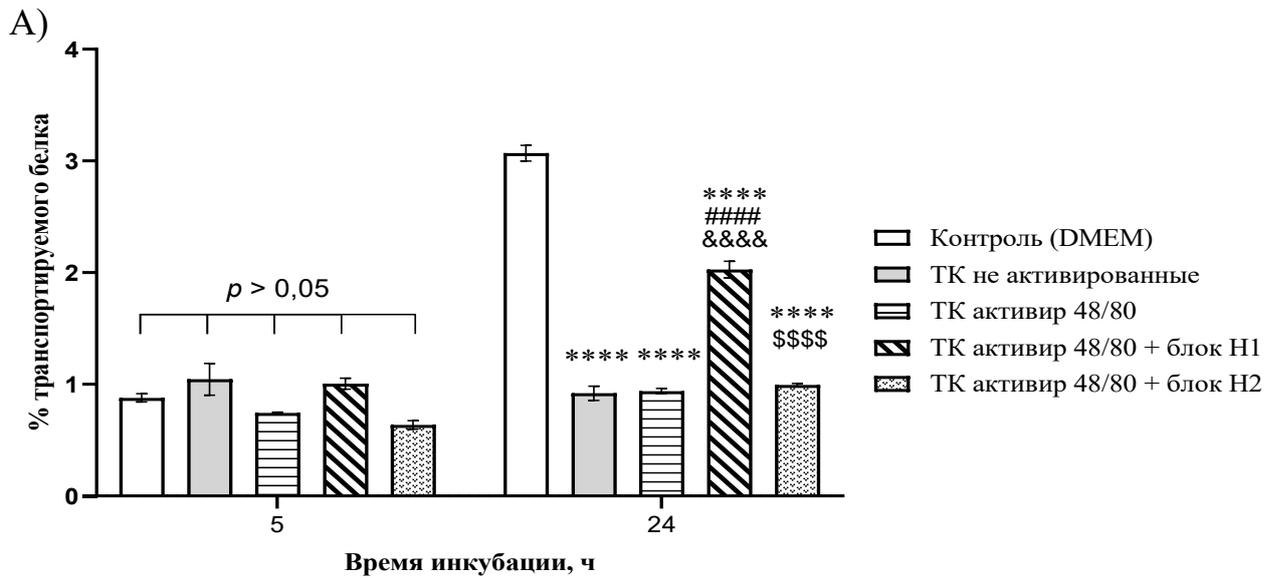


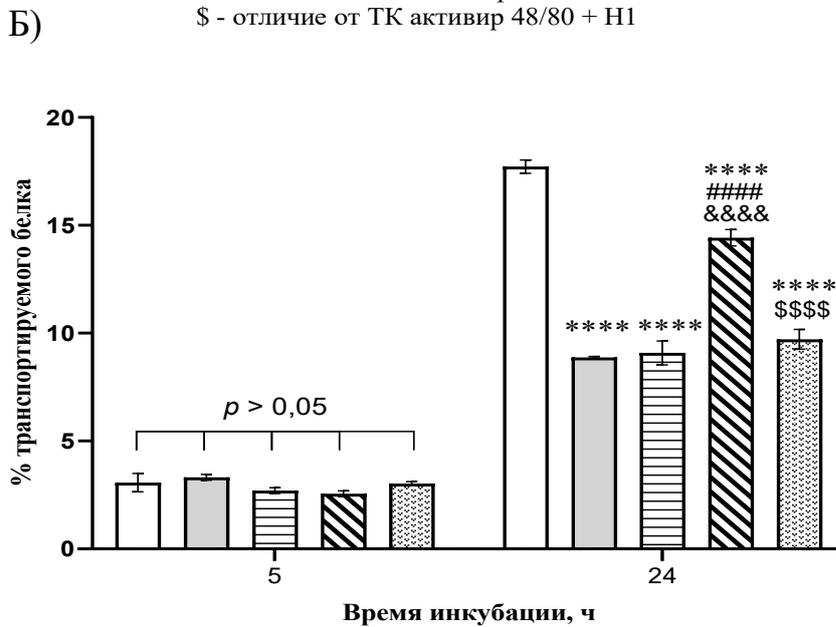
Рисунок 30. Влияние находящихся в нижней камере интактных тучных клеток человека НМС-1, активированных предварительной инкубацией с агрегированным IgG человека (aIgG) на транспорт альбумина и ЛПНП через эндотелиальный монослой (в % от добавленного в верхнюю камеру белка) и его зависимость от гистаминовых рецепторов H1 и H2. Супрастин и квамател использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно. Инкубация в течение 24 ч. Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки. ****, ####, \$\$\$ - $p < 0,0001$

- а) ЛПНП,
 б) альбумин.

Тучные клетки, активированные веществом 48/80 (продукт конденсации п-метокси-N-метилфенэтиламина с формальдегидом [238, 239]), проявляют аналогичный эффект воздействия, как и тучные клетки, активированные агрегированным иммуноглобулином IgG, т.е. подавляют трансэндотелиальный транспорт альбумина и ЛПНП и этот эффект частично отменяется ингибитором H1, но не H2 гистаминовых рецепторов. Результаты представлены на рисунке 31.



* - отличие от контроля
 # - отличие от ТК не активированные
 & - отличие от ТК активир 48/80
 \$ - отличие от ТК активир 48/80 + H1



* - отличие от контроля
 # - отличие от ТК не активированные
 & - отличие от ТК активир 48/80
 \$ - отличие от ТК активир 48/80 + H1

Рисунок 31. Влияние находящихся в нижней камере интактных тучных клеток человека НМС-1, активированных предварительной инкубацией с веществом 48/80 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. Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки.

****, #####, \$\$\$\$ – $p < 0,0001$

а) ЛПНП,

б) альбумин.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности тучных клеток влиять на трансэндотелиальный транспорт белковых молекул и ЛПНП с помощью гуморальных посредников. Наиболее вероятным и одним из основных действующих агентов является гистамин, реализующий свой эффект через H1 гистаминовый рецептор эндотелиоцитов линии EA.hy926. Причем, тучные клетки оказывают более сильное влияние на прохождение через эндотелий ЛПНП, чем альбумина.

3.5. Влияние ЛПС на проницаемость эндотелиального монослоя.

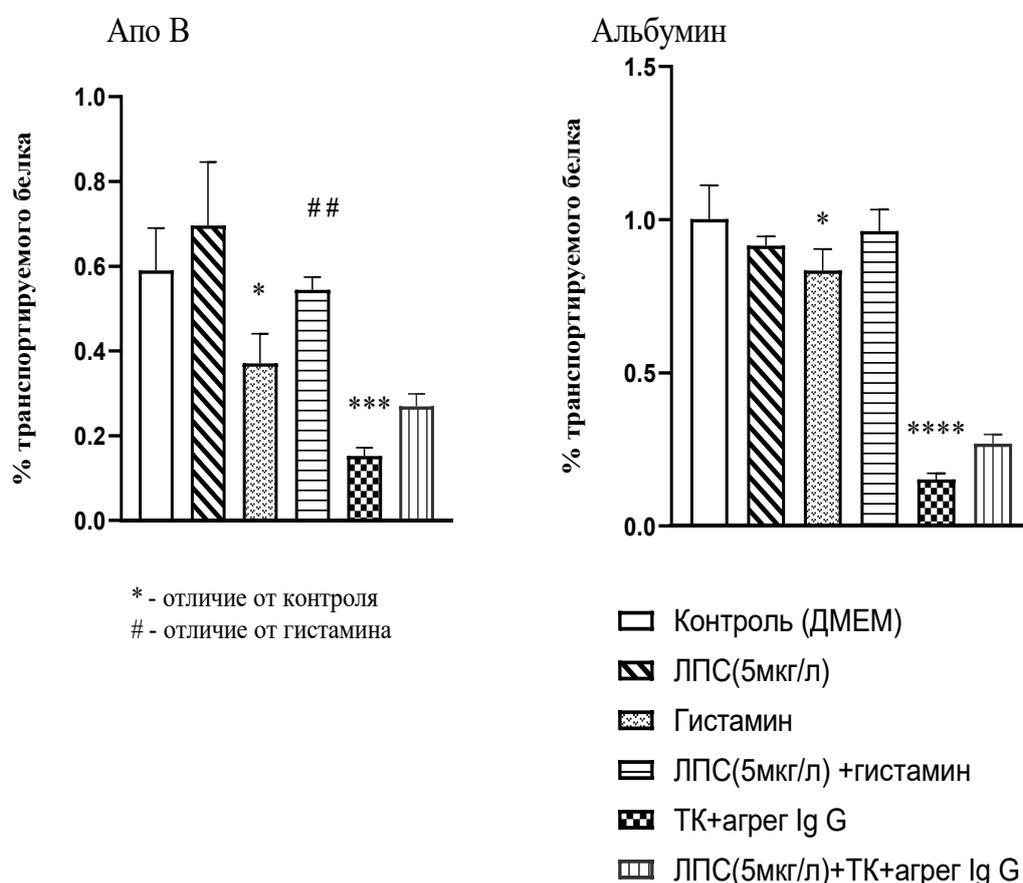


Рисунок 32. Влияние ЛПС на транспорт белков и ЛПНП плазмы крови через эндотелиальный монослой (в % от добавленных белков в верхнюю камеру). Инкубация в течение 24 ч. Двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Холма-Шидака

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

ЛПС, также известный как эндотоксин, вызывает системный воспалительный ответ, сопровождающийся увеличением проницаемости сосудов *in vivo* [64].

При воздействии ЛПС на монослой эндотелиальных клеток EA.hy926 в используемой нами модели не было обнаружено достоверного влияния на трансэндотелиальный транспорт ЛПП (Рисунок 32). Отсутствие достоверного эффекта можно объяснить необходимостью присутствия макрофагов, которые являются посредниками между эндотелиальными клетками и ЛПС.

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 [241], что предупреждает связывание ЛПС 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: ранняя фаза действия гистамина продолжительностью около часа, в течение которой транспорт ЛПНП усиливается, и вторая, отсроченная, фаза, длящаяся до конца первых суток, когда трансэндотелиальный транспорт ЛПНП существенно снижается. Таким образом, эндотелий отвечает на гистамин быстрым, но кратковременным повышением проницаемости для компонентов плазмы 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 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 СОКРАЩЕНИЙ

Апо А-1 — Аполипопротеин А-1

Апо В — аполипопротеин В

АТФ — аденозинтрифосфат

ИЛ — интерлейкин

ЛПНП — липопротеины низкой плотности

ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности

ЛПВП — липопротеины высокой плотности

ЛПС — липополисахарид

окЛПНП — окисленный ЛПНП

ТК — тучные клетки

ТЭТ — трансэндотелиальный транспорт

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

CRP — С-реактивный белок

EDHF — гиперполяризующий фактор эндотелия

ЕТ — эндотелин JNK – N-концевые киназы c-Jun

ICAM-1 — молекулы межклеточной адгезии-1

IFN — интерферон

IgE — иммуноглобулина Е

M_r — молекулярный радиус

МСР-1 — белок хемотаксиса моноцитов

NO — оксид азота

TLR — Toll-подобные рецепторы

TNF α — фактор некроза опухоли

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

VCAM — васкулярные (сосудистые) молекулы клеточной адгезии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kovanen P.T. Mast Cells as Potential Accelerators of Human Atherosclerosis—From Early to Late Lesions. / P.T. Kovanen // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 4479.
2. Chatterjee V. Aging-associated shifts in functional status of mast cells located by adult and aged mesenteric lymphatic vessels. / V. Chatterjee, A.A. Gashev // *Am J Physiol Heart Circ Physiol* – 2012. – Vol. 303. – P. 693–702.
3. Jeziorska M. Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. / M. Jeziorska, C. McCollum, D.E. Woolley // *J Pathol* – 1997. – Vol. 182. – P. 115–122.
4. He S.H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. / S.H. He // *World J. Gastroenterol* – 2004. – Vol. 10, №3. – P. 309–318.
5. Кондашевская М.В. Гепарин в защитно-приспособительных реакциях организма. Обзор. / М.В. Кондашевская // *Журн. Тромбоз, Гемостаз и Реология* – 2000. – Т. 3 – С. 26–28.
6. Bot I. Mast cells: pivotal players in cardiovascular diseases. / I. Bot, T.J.C. van Berkel, A.L. Erik // *Curr Cardiol Rev* – 2008. – Vol. 4, №3. – P. 170–178.
7. Forman M.B. Increased adventitial mast cells in a patient with coronary spasm. / M.B. Forman, J.A. Oates, D. Robertson, R.M. Robertson, L.J. Roberts, R.N. Virmani // *Eng J Med* – 1985. – Vol. 313. – P. 1138–1141.
8. Walia D.S. Human Mast Cells (HMC-15C6) Enhance Interleukin-6 Production by Quiescent and Lipopolysaccharide - Stimulated Human Coronary Artery Endothelial Cells. / D.S. Walia, M. Sharma, V.V. Raveendran, J. Zhou, R. Sharma, D.J. Stechschulte, K.N. Dileepan // *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* – 2012. – P. 1–10.
9. Sakata Y. Elevation of the plasma histamine concentration in the coronary circulation in patients with variant angina. / Y. Sakata, K. Komamura, A. Hirayama et al. // *American Journal of Cardiology* – 1996. – Vol. 77, №12. – P. 1121–1125.
10. Kalsner S. Coronary arteries of cardiac patients are hyperreactive and contain stores of amines: a mechanism for coronary spasm. / S. Kalsner, R. Richards // *Science* – 1984. – Vol. 223. – P. 1435–1437.
11. Wu N.Z. Transient venular permeability increase and endothelial gap formation induced by histamine. / N.Z. Wu, A.L. Baldwin // *Am J Physiol* – 1992. – Vol. 262. – P. 1238–1247.
12. Heltianu C. Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules. / C. Heltianu, M. Simionescu, N. Simionescu // *J Cell Biol* – 1982. – Vol. 93, №2. – P. 357–364.

13. Kunder C.A. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. / C.A. Kunder, A.L. St John, S.N. Abraham // *Blood* – 2011. – Vol. 118, № 20. – P. 5383–5393.
14. Heltianu C. Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules. / C. Heltianu, M. Simionescu, N. Simionescu // *J. Cell. Biol* – 1982. – Vol. 93, №2. – P. 357–364.
15. Wang K.Y. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein E knockout mice independently of serum cholesterol level. / K.Y. Wang, A. Tanimoto, X. Guo, S. Yamada, S. Shimajiri, et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 2011. – Vol. 31. – P. 800–807.
16. Marcelino da Silva E. Z. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. / E. Z. Marcelino da Silva, M.C. Jamur, C. Oliver // *J Histochem Cytochem* – 2014. – Vol. 62. – P. 698–738.
17. Fadini G.P. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. / G.P. Fadini, A. Avogaro // *Cardiovascular Research* – 2010. – Vol. 87, № 1. – P. 406–423.
18. Vane J.R. Regulatory functions of the vascular endothelium. / J.R. Vane, E.E. Anggard, R.M. Botting // *The New England journal of medicine* – 1990. – Vol. 323. – P. 27–36.
19. Griendling K.K. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. / K.K. Griendling, R.W. Alexander // *Federation of American Societies for Experimental Biology journal* – 1996. – Vol. 10. – P. 283–292.
20. Galley H.F. Physiology of the endothelium. / H.F. Galley, N.R. Webster // *British journal of anaesthesia* – 2004. – Vol. 93, № 1. – P. 105–113.
21. Choi K. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. / K. Choi, M. Kennedy, A. Kazarov, J.C. Papadimitriou, G. Keller // *Development* – 1998. – Vol. 125, № 4. – P. 725–732.
22. Gallagher G. Vascular endothelial cells. / G. Gallagher, B.E. Sumpio // *Futura Publishing Co* – 1997. – P. 151–186.
23. Galley H.F. Variability in E-selectin expression, mRNA levels and sE-selectin release between endothelial cell lines and primary endothelial cells. / H.F. Galley, M.G. Blaylock, A.M. Dubbels, N.R. Webster // *Cell biology international* – 2000. – Vol. 24. – P. 91–99.
24. Hagensen M.K. Arterial endothelial cells: still the craftsmen of regenerated endothelium. / M.K. Hagensen, P.M. Vanhoutte, J.F. Bentzon // *Cardiovasc Res.* – 2012. – Vol. 95, № 3. – P. 281–289.
25. Luft J.H. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. / J.H. Luft // *Federation proceedings* – 1966. – Vol. 25. – P. 1773–1783.

26. Pries A.R. The endothelial surface layer. / A.R. Pries, T.W. Secomb, P. Gaehtgens // *Pfluegers Archiv* – 2000. – Vol. 440. – P. 653–666.
27. Aird W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. / W.C. Aird // *Circ Res.* – 2007. – Vol. 100. – P. 158–173.
28. Pries A.R. The endothelial surface layer. / A.R. Pries, T.W. Secomb, P. Gaehtgens // *Pflügers Arch – Eur J Physiol* – 2000. – Vol. 440. – P. 653–666.
29. Okada H. Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions. / H. Okada, G. Takemura, K. Suzuki, K. Oda, C. Takada, Y. Hotta, et al. // *Crit Care.* – 2017. – Vol. 21. – P. 261.
30. Mann G.E. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. / G.E. Mann, D.L. Yudilevich, L. Sobrevia // *Physiol Rev* – 2003. – Vol. 83. – P. 183–252.
31. Sandoo A. The endothelium and its role in regulating vascular tone. / A. Sandoo, Jet J C S Veldhuijzen van Zanten, G.S. Metsios, D. Carroll, G.D. Kitas // *Open Cardiovasc Med J.* – 2010. – Vol. 4. – P. 302–312.
32. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. / H. Shimokawa // *J Mol Cell Cardiol* – 1999. – Vol. 31, №1. – P. 664–666.
33. Furchgott R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki // *Nature* – 1980. – Vol. 288. – P. 373–376.
34. Vallance P. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. / P. Vallance, J. Collier, S. Moncada // *Lancet* – 1989. – Vol. 2. – P. 997–1000.
35. Sandoo A. The role of inflammation and cardiovascular disease risk on microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. / A. Sandoo, G.D. Kitas, D. Carroll, Jet J C S Veldhuijzen van Zanten. // *Arthritis research and therapy* – 2012. – Vol. 14, №3. – P. R117.
36. Palmer R.M. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. / R.M. Palmer, D.S. Ashton, S. Moncada // *Nature* – 1988. – Vol. 333. – P. 664–666.
37. Lamas S. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. / S. Lamas, P.A. Marsden, G.K. Li, P. Tempst, T. Michel // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1992. – Vol. 89. – P. 6348–6352.
38. Bucci M. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. / M. Bucci, J.P. Gratton, R.D. Rudic, et al. // *Nat Med* – 2000. – Vol. 6. – P. 1362–1367.
39. Bae S.W. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. / S.W. Bae, H.S. Kim, Y.N.

- Cha, Y.S. Park, S.A. Jo, I. Jo // *Biochem Biophys Res Commun* – 2003. – Vol. 306. – P. 981–987.
40. Moncada S. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. / S. Moncada, E.A. Higgs // *Br J Pharmacol* – 2006. – Vol. 147, № 1. – P. 193–201.
 41. Bunting S. The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. / S. Bunting, S. Moncada, J.R. Vane // *Br Med Bull* – 1983. – Vol. 39. – P. 271–276.
 42. Flavahan N.A. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. / N.A. Flavahan // *Trends Pharmacol Sci* – 2007. – Vol. 28. – P. 106–110.
 43. FitzGerald G.A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. / G.A. FitzGerald // *Am J Cardiol* – 1991. – Vol. 68. – P. 11B–15B.
 44. Radomski M.W. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. / M.W. Radomski, R.M. Palmer, S. Moncada // *Br J Pharmacol* – 1987. – Vol. 92. – P. 639–646.
 45. Inoue A. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. / A. Inoue, M. Yanagisawa, S. Kimura, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1989. – Vol. 86. – P. 2863–2867.
 46. Gardiner S.M. Effects of an ET1-receptor antagonist, FR139317, on regional haemodynamic responses to endothelin-1 and [Ala11,15] Ac-endothelin-1 (6±21) in conscious rats. / S.M. Gardiner, P.A. Kemp, J.E. March, T. Bennett, A.P. Davenport, L. Edvinsson // *Br J Pharmacol* – 1994. – Vol. 112. – P. 477–486.
 47. Alonso D. The nitric oxide-endothelin-1 connection. / D. Alonso, M.W. Radomski // *Heart Fail Rev* – 2003. – Vol. 8. – P. 107–115.
 48. Feletou M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. / M. Feletou, P.M. Vanhoutte // *Br J Pharmacol* – 1988. – Vol. 93. – P. 515–524.
 49. Cohen R.A. Endothelium-Dependent Hyperpolarization: Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. / R.A. Cohen, P.M. Vanhoutte // *Circulation* – 1995. – Vol. 92. – P. 3337–3349.
 50. Lüscher T.F. Biology of the endothelium. / T.F. Lüscher, M. Barton // *Clinical cardiology* – 1997. – Vol. 20. – P. 3–10.
 51. Galley H.F. Endothelial cell±cytokine interactions. / H.F. Galley // *Br J Intensive Care* – 1999. – Vol. 9. – P. 147–151.
 52. Colotta F. Chemoattractants induce rapid release of the interleukin 1 type II decoy receptor in human polymorphonuclear cells. / F. Colotta, S. Orlando, E.J. Fadlon, S. Sozzani, C. Matteucci, A. Mantovani // *J Exp Med* – 1995. – Vol. 181. – P. 2181–2186.

53. Muller W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. / W.A. Muller // *Trends Immunol* – 2003. – Vol. 24. – P. 327–334.
54. Mantovani A. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. / A. Mantovani, F. Bussolino, M. Introna // *Immunol Today* – 1997. – Vol. 18. – P. 231–240.
55. Esmon C.T. The protein C anticoagulant pathway. / C.T. Esmon // *Arterioscler Thromb* – 1992. – Vol. 12. – P. 135–145.
56. Cross M.J. VEGF receptor signal transduction. / M.J. Cross, J. Dixelius, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh // *Trends Biochem Sci* – 2003. – Vol. 28. – P. 488–494.
57. Денисенко А.Д. Патогенез атеросклероза. В учебном пособии: «Патофизиология обмена веществ». / А.Д. Денисенко, П.В. Бовтюшко, А.Н. Юсупов. Ред. В.Н. Цыган. – СПб.: СпецЛит, 2013. – С.143–164.
58. Липовецкий Б.М. Атеросклероз и его осложнения со стороны сердца, мозга и аорты. (Диагностика, течение, профилактика): руководство для врачей. / Б. М. Липовецкий. – СПб., 2013. – 149 с.
59. Borén J. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. / J. Borén, K. Olin, I. Lee, A. Chait, T.N. Wight // *Innerarity J Clin Invest* – 1998. – Vol. 101, №12. – P. 2658–2664.
60. Stevens T. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. / T. Stevens, J.G. Garcia, D.M. Shasby, J. Bhattacharya, A.B. Malik // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2000. – Vol. 279, №3. – P. 419–422.
61. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. / R. Medzhitov // *Nature Rev Immunol* – 2001. – Vol. 1. – P. 135–145.
62. Lee M.M. Time-dependent effects of endotoxin on the ultrastructure of aortic endothelium. / M.M. Lee, G.B. Schuessler, S. Chien // *Artery* – 1988. – Vol. 15. – P. 71–89.
63. Sawada N. Tight junctions and human diseases. / N. Sawada, M. Murata, K. Kikuchi, et al. // *Med Electron Microsc* – 2003. – Vol. 36. – P. 147–156.
64. Mehta D. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. / D. Mehta, A.B. Malik // *Physiol Rev*. – 2006. – Vol. 86, №1. – P. 279–367.
65. Ghitescu L. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor mediated transcytosis. / L. Ghitescu, A. Fixman, M. Simionescu, N. Simionescu // *J Cell Biol* – 1986. – Vol. 102. – P. 1304–1311.
66. Pappenheimer J.R. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. / J.R. Pappenheimer, E.M. Renkin, L.M. Borrero // *Am J Physiol* – 1951. – Vol. 167. – P. 13–46.

67. Michel C.C. Microvascular permeability. / C.C. Michel, F.E. Curry // *Physiol Rev* – 1999. – Vol. 79. – P. 703–761.
68. Verkman A.S. Role of aquaporin water channels in kidney and lung. / A.S. Verkman // *Am J Med Sci* – 1998. – Vol. 316. – P. 310–320.
69. Bundgaard M. The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. / M. Bundgaard // *J Ultrastruct Res* – 1984. – Vol. 88. – P. 1–17.
70. Sawada N. Tight junctions and human diseases. / N. Sawada, M. Murata, K. Kikuchi, et al. // *Med Electron Microsc* – 2003. – Vol. 36. – P. 147–156.
71. Wysolmerski R.B. Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. / R.B. Wysolmerski, D. Lagunoff // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 1990. – Vol. 87. – P. 16–20.
72. Schnittler H-J. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. / H-J. Schnittler, A. Wilke, T. Gress, N. Suttorp, D. Drenckhahn // *J Physiol* – 1990. – Vol. 431. – P. 379–401.
73. Baluk P. The β 2-adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvascular leakage by inhibiting endothelial gap formation. / P. Baluk, D.M. McDonald // *Am J Physiol* – 1994. – Vol. 266. – P. 461–468.
74. Moy A.B. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. / A.B. Moy, J. Van Engelenhoven, J. Bodmer, J. Kamath, C. Keese, I. Giaever, S. Shasby, D.M. Shasby // *J Clin Invest* – 1996. – Vol. 97. – P. 1020–1027.
75. Guelte A.L. Role of endothelial cell-cell junctions in endothelial permeability. / A.L. Guelte, J. Gavard // *Methods Mol Biol* – 2011. – Vol. 763. – P. 265–279.
76. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. / E. Dejana // *Nat Rev Mol Cell Biol* – 2004. – Vol. 5, №4. – P. 261–270.
77. Guelte A.Le. Role of endothelial cell-cell junctions in endothelial permeability. / A. Le Guelte, J. Gavard // *Methods Mol Biol*. – 2011. – Vol. 763. – P. 265–279.
78. Gavard J. VE-cadherin and claudin-5: it takes two totango. / J. Gavard, J.S. Gutkind // *Nat. Cell Biol* – 2008. – Vol. 10. – P. 883–885.
79. Matter K. Signalling to and from tight junctions. / K. Matter, M.S. Balda // *Nat.Rev. Mol. Cell Biol* – 2003. – Vol. 4. – P. 225–236.
80. Dejana E. Endothelial cell–cell junctions: happy together. / E. Dejana // *Nat. Rev.Mol. Cell Biol* – 2004. – Vol. 5. – P. 261–270.
81. Wallez Y. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. / Y. Wallez, P. Huber // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – Vol. 1778, №3. – P. 794–809.
82. Gavard J. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. / J. Gavard, J.S. Gutkind // *Nat.Cell Biol* – 2006. – Vol. 8. – P. 1223–1234.

83. Taddei A. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. / A. Taddei, et al. // *Nat. Cell Biol* – 2008. – Vol. 10. – P. 923–934.
84. Paik J.H. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. / J.H. Paik, A. Skoura, S.S. Chae, A.E. Cowan, D.K. Han, R.L. Proia, T. Hla // *Genes and development* – 2004. – Vol. 18. – P. 2392–2403.
85. Crosby C.V. VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. / C.V. Crosby, P.A. Fleming, W.S. Argraves, M. Corada, L. Zanetta, E. Dejana, C.J. Drake // *Blood* – 2005. – Vol. 105. – P. 2771–2776.
86. Fukuhara S. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell–cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac–Rap1 signaling pathway. / S. Fukuhara, et al. // *Mol. Cell Biol* – 2005. – Vol. 25. – P. 136–146.
87. Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. / J. Gavard // *FEBS Lett* – 2009. – Vol. 583, №1. – P. 1–6.
88. Simionescu N. Transcytosis and traffic of membranes in the endothelial cells. / N. Simionescu // In: *International Cell Biology* – 1981. – P. 657–672.
89. Simionescu M. Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. / N. Simionescu // *Cell Biol Rev* – 1991. – Vol. 25. – P. 1–78.
90. Palade G.E. Structural modulations of plasmalemmal vesicles. / G.E. Palade, R.R. Bruns // *J Cell Biol* – 1968. – Vol. 37. – P. 633–649.
91. Dutta D. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. / D. Dutta, J.G. Donaldson // *Cell Logist* – 2012. – Vol. 2, №4. – P. 203–208.
92. Kohn S. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. / S. Kohn, J.A. Nagy, H.F. Dvorak, A.M. Dvorak // *Lab Invest* – 1992. – Vol. 67. – P. 596–607.
93. Feng D. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. / D. Feng, J.A. Nagy, J. Hipp, H.F. Dvorak, A.M. Dvorak // *J Exp Med* – 1996. – Vol. 183, №5. – P. 1981–1986.
94. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. / E. Yamada // *J Biophys Biochem Cytol* – 1955. – Vol. 1. – P. 445–458.
95. Lamaze C. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. / C. Lamaze, et al. / *Mol Cell* – 2001. – Vol. 7, №3. – P. 661–671.
96. Carpentier J.L. Co-localization of ¹²⁵I-epidermal growth factor and ferritin-low density lipoprotein in coated pits: a quantitative electron microscopic study in

- normal and mutant human fibroblasts. / J.L. Carpentier, et al. // *J Cell Biol* – 1982. – Vol. 95. – P. 73–77.
97. Lusic A.J. Atherosclerosis. / A.J. Lusic // *Nature* – 2000. – Vol. 407, №6801. – P. 233–241.
 98. Neutra M.R. Intracellular transport of transferrin- and asialoorosomuroid-colloidal gold conjugates to lysosomes after receptor-mediated endocytosis. / M.R. Neutra, et al. // *J Histochem Cytochem* – 1985. – Vol. 33. – P. 1134–1144.
 99. Robinson M.S. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. / M.S. Robinson // *Traffic* – 2015. – Vol. 16, №12. – P. 1210–1238.
 100. Kirchhausen T. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. / T. Kirchhausen, D. Owen, S.C. Harrison // *Cold Spring Harb Perspect Biol* – 2014. – Vol. 6, №5. – P. 1–26.
 101. Kirchhausen T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. / T. Kirchhausen // *Annu Rev Cell Dev Biol* – 1999. – Vol. 15. – P. 705–732.
 102. Traub L.M. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. / L.M. Traub, J.S. Bonifacino // *Cold Spring Harb Perspect Biol* – 2013. – Vol. 5, №11. – P. 1–23.
 103. Aguet F. Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. / F. Aguet, et al. // *Dev Cell* – 2013. – Vol. 26, №3. – P. 279–291.
 104. Schmid S.L.V. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. / S.L.V. Schmid, A. Frolov // *Annu Rev Cell Dev Biol* – 2011. – Vol. 27. – P. 79–105.
 105. Parton R.G. The multiple faces of caveolae. / R.G. Parton, K. Simons // *Nat Rev Mol Cell Biol* – 2007. – Vol. 8. – P. 185–194.
 106. Roth T.F. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. / T.F. Roth, K.R. Porter // *J Cell Biol* – 1964. – Vol. 20. – P. 313–332.
 107. Pelkmans L. Endocytosis via caveolae. / L. Pelkmans, A. Helenius // *Traffic* – 2002. – Vol. 3, №5. – P. 311–320.
 108. Frank P.G. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. / P.G. Frank, S. Pavlides, M.P. Lisanti // *Cell Tissue Res* – 2009. – Vol. 335. – P. 41–47.
 109. Parton R.G. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. / R.G. Parton, M.A. del Pozo // *Nat Rev Mol Cell Biol* – 2013. – Vol. 1. – P. 98–112.
 110. Minshall R.D. Caveolin regulation of endothelial function. / R.D. Minshall, W.C. Sessa, R.V. Stan, R.G. Anderson, A.B. Malik // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2003. – Vol. 286. – P. 1179–1183.
 111. Kiss A.L. Caveolae and the regulation of endocytosis. / A.L. Kiss // *Adv Exp Med Biol* – 2012. – Vol. 729. – P. 14–28.
 112. Parton R.G. Regulated internalization of caveolae. / R.G. Parton, B. Joggerst, K. Simons // *J Cell Biol* – 1994. – Vol. 127. – P. 1199–1215.

113. Henley J.R. Dynamin-mediated internalization of caveolae. / J.R. Henley, et al. // *J Cell Biol* – 1998. – Vol. 141. – P. 85–99.
114. Sandvig K. Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. / K. Sandvig, B. van Deurs // *J Biol Chem* – 1990. – Vol. 265, №11. – P. 6382–6388.
115. Frank P.G. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia. / P.G. Frank, M.P. Lisanti // *Current Opin Lipidol* – 2004. – Vol. 15. – P. 523–529.
116. Simionescu N. The microvascular endothelium: segmental differentiations, transcytosis, selective distribution of anionic sites. / N. Simionescu // *Advances in inflammation research*. Raven Press – 1979. – Vol. 1. – P. 61–70.
117. Lum H. Regulation of vascular endothelial barrier function. / H. Lum, A.B. Malik // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 1994. – Vol. 267. – P. 223–241.
118. Predescu S.A. Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. / S.A. Predescu, D.N. Predescu, A.B. Malik // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2007. – Vol. 293, №4. – P. 823–842.
119. Alexander J.S. Inflammatory mediators induce sequestration of VE-cadherin in cultured human endothelial cells. / J.S. Alexander, B.C. Alexander, L.A. Eppihimer, N. Goodyear, R. Haque, C.P. Davis, T.J. Kalogeris, D.L. Carden, Y.N. Zhu, C.G. Kevil // *Inflammation* – 2000. – Vol. 24, №2. – P. 99–113.
120. Moelants E.A.V. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. / E.A.V. Moelants, A. Mortier, J.V. Damme, P. Proost // *Immunol Cell Biol* – 2013. – Vol. 91, №6. – P. 393–401.
121. Idriss H.T. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). / H.T. Idriss, J.H. Naismith // *Microsc Res Tech* – 2000. – Vol. 50, №3. – P. 184–195.
122. Lum H. Mechanisms of increased endothelial permeability. / H. Lum, A.B. Malik // *Can J Physiol Pharmacol* – 1996. – Vol. 74. – P. 787–800.
123. Mencoboni M. Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple actions. / M. Mencoboni, R. Lerza, G. Bogliolo // *Recenti Prog Med* – 1992. – Vol. 83, №1. – P. 15.
124. Woolley D.E. Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. / D.E. Woolley, L.C. Tetlow // *Arthritis Res* – 2000. – Vol. 2, №1. – P. 65–74.
125. Lo S.K. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD18- dependent mechanisms. / S.K. Lo, J. Everitt, J. Gu, A.B. Malik // *J Clin Invest* – 1992. – Vol. 89. – P. 981–988.
126. Yao Z.Y. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. / Z.Y. Yao, Y. Zhang, H.B. Wu // *Inflamm Res* – 2019. – Vol. 68, №10. – P. 815–823.
127. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления / П.Г. Назаров. – СПб.: Наука, 2001. – 423 с.

128. Wu Y. C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. / Y. Wu, L.A. Potempa, D.E. Kebir, J.G. Filep // *Biol Chem* – 2015. – Vol. 396, №11. – P.1181–1197.
129. Black S. C-reactive Protein. / S. Black, I. Kushner, D. Samols // *J Biol Chem* – 2004. – Vol. 279, №47. – P.48487–48490.
130. Mold C. C-Reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcγR. / C. Mold, W. Rodriguez, B. Rodic-Polic, T.W. Du Clos // *J. Immunol* – 2002. – Vol. 169. – P.7019 –7025.
131. Szalai A.J. Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. / A.J. Szalai, S. Nataf, X.Z. Hu, S.R. Barnum // *J. Immunol* – 2002. – Vol. 168. – P.5792–5797.
132. Ballou S.P. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. / S.P. Ballou, G. Lozanski // *Cytokine* – 1992. – Vol. 4. – P.361–368.
133. Chang M.K. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. / M.K. Chang, C.J. Binder, M. Torzewski, J.L. Witztum // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – Vol. 99. – P.13043–13048.
134. Zwaka T.P. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. / T.P. Zwaka, V. Hombach, J. Torzewski // *Circulation* – 2001. – Vol. 103. – P.1194 –1197.
135. Paul A. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. / A. Paul, K.W. Ko, L. Li, V. Yechoor, M.A. McCrory, A.J. Szalai, L. Chan // *Circulation* – 2004. – Vol. 109. – P.647– 655.
136. Danenberg H.D. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein–transgenic mice. / H.D. Danenberg, A.J. Szalai, R.V. Swaminathan, L. Peng, Z. Chen, P. Seifert, W.P. Fay, D.I. Simon, E.R. Edelman // *Circulation* – 2003. – Vol. 108. – P.512–515.
137. Badimon L. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. / L. Badimon, E. Peña, G. Arderiu, T. Padró, M. Slevin, G. Vilahur, G. Chiva-Blanch // *Front Immunol* – 2018. – Vol. 9. – P.430.
138. Климов А.Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Руководство для врачей. / А.Н. Климов, Н.Г. Никульчева. – СПб.: Питер, 1999. — 512 с.
139. Сергиенко И. В. Дислипидемии, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца. Генетика, патогенез, фенотипы, диагностика, терапия, коморбидность. / И.В. Сергиенко, А.А. Аншелес, В.В. Кухарчук. – Москва, 2020. – 295 с.
140. Gofman J.W. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. / J.W. Gofman, F.T. Lindgren, H. Elliott // *J Biol Chem* – 1949. – Vol. 179, №2. – P.973–979.

141. Berneis K.K. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. / K.K. Berneis, R.M. Krauss // *J Lipid Res* – 2002. – Vol. 43. – P.1363–1379.
142. Rhoads J.P. How Oxidized Low-Density Lipoprotein Activates Inflammatory Responses. / J.P. Rhoads, A.S. Major // *Crit Rev Immunol* – 2018. – Vol. 38, №4. – P.333–342.
143. Mundi S. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review. / S. Mundi, M. Massaro, E. Scoditti, M.A. Carluccio, V.W.M. van Hinsbergh, M.L. Iruela-Arispe, R. De Caterina // *Cardiovasc Res* – 2018. – Vol. 114. – P.35–52.
144. Zanoni P. Endocytosis of lipoproteins. / P. Zanoni, S. Velagapudi, M. Yalcinkaya, L. Rohrer, A. von Eckardstein // *Atherosclerosis* – 2018. – Vol. 275. – P.2793–295.
145. Nordestgaard B.G. The vascular endothelial barrier—selective retention of lipoproteins. / B.G. Nordestgaard // *Curr Opin Lipidol* – 1996. – Vol. 7. – P.269–273.
146. Huang L. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. / L. Huang, K.L. Chambliss, X. Gao, I.S. Yuhanna, E. Behling-Kelly, S. Bergaya, M. Ahmed, P. Michaely, K. Luby-Phelps, A. Darehshouri, L. Xu, E.A. Fisher, et al. // *Nature* – 2019. – Vol. 569. – P.565–569.
147. Kraehling J.R. Genome-wide RNAi screen reveals ALK1 mediates LDL uptake and transcytosis in endothelial cells. / J.R. Kraehling, J.H. Chidlow, C. Rajagopal, M.G. Sugiyama, J.W. Fowler, M.Y. Lee, X. Zhang, C.M. Ramírez, E.J. Park, B. Tao, K. Chen, L. Kuruvilla, B. Larrivee', et al. // *Nat Commun* – 2016. – Vol. 7. – P.13516.
148. Zhang X. Endothelial transcytosis of lipoproteins in atherosclerosis. / X. Zhang, W.C. Sessa, C. Fernandez-Hernando // *Front Cardiovasc Med* – 2018. – Vol. 5. – P.130.
149. Dehouck B. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. / B. Dehouck, L. Fenart, M.P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, R. Cecchelli // *J Cell Biol* – 1997. – Vol. 138. – P.877–889.
150. Armstrong S.M. A novel assay uncovers an unexpected role for SR-BI in LDL transcytosis. / S.M. Armstrong, M.G. Sugiyama, K.Y. Fung, Y. Gao, C. Wang, A.S. Levy, P. Azizi, et al. // *Cardiovasc Res* – 2015. – Vol. 108. – P.268–277.
151. Thongtang N. Metabolism and proteomics of large and small dense LDL in combined hyperlipidemia: effects of rosuvastatin. / N. Thongtang, M.R. Diffenderfer, E.M.M. Ooi, P.H.R. Barrett, S.M. Turner, N.A. Le, W.V. Brown, E.J. Schaefer // *J Lipid Res* – 2017. – Vol. 58. – P.1315–1324.
152. Williams K.J. How an artery heals. / K.J. Williams, I. Tabas, E.A. Fisher // *Circ Res* – 2015. – Vol. 117. – P.909–913.

153. Skalen K. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. / K. Skalen, M. Gustafsson, E.K. Rydberg, L.M. Hulthen, O. Wiklund, T.L. Innerarity, J. Boren // *Nature* – 2002. – Vol. 417. – P.750–754.
154. Borén J. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. / J. Borén, M.J. Chapman, R.M. Krauss, et al. // *Eur Heart J* – 2020. – Vol. 41, №24. – P.2313–2330.
155. Weber C. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. / C. Weber, H. Noels // *Nat Med* – 2011. – Vol. 17. – P.1410–1422.
156. Moore K.J. Macrophage trafficking, inflammatory resolution, and genomics in atherosclerosis: JACC macrophage in CVD series (Part 2). / K.J. Moore, S. Koplev, E.A. Fisher, I. Tabas, J.L.M. Bjorkegren, A.C. Doran, J.C. Kovacic // *J Am Coll Cardiol* – 2018. – Vol. 72. – P.2181–2197.
157. Kontush A. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. / A. Kontush, M.J. Chapman // *Curr Opin Lipidol* – 2010. – Vol. 21, №4. – P.312–318.
158. Kontush A. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. / A. Kontush, M. Lindahl, M. Lhomme, L. Calabresi, M.J. Chapman, W.S. Davidson // *Handb Exp Pharmacol* – 2015. – Vol. 224. – P.3–51.
159. Schaefer E.J. Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. / E.J. Schaefer, et al. // *Curr Opin Lipidol* – 2010. – Vol. 21, №4. – P.289–297.
160. Ertek S. High-density Lipoprotein (HDL) Dysfunction and the Future of HDL. / S. Ertek // *Curr Vasc Pharmacol* – 2018. – Vol. 16, №5. – P.490–498.
161. Pirillo A. Biological Consequences of Dysfunctional HDL. / A. Pirillo, A.L. Catapano, G.D. Norata // *Curr Med Chem* – 2019. – Vol. 26, №9. – P.1644–1664.
162. Aman J. Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities. / J. Aman, E.M. Weijers, G.P. van Nieuw Amerongen, A.B. Malik, Victor W.M. van Hinsbergh. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2016. – Vol. 311, №2. – P.453–466.
163. Lindahl U. What else can 'Heparin' do? / U. Lindahl // *Haemostasis* – 1999. – Vol. 29, №1. – P.38–47.
164. Irani A.M. Human mast cell heterogeneity / A.M. Irani, L.B. Schwartz // *Allergy Proc* – 1994. – Vol. 15. – P.303–308.
165. Friend D. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype / D.S. Friend, N. Ghildyal, K.F. Austen, M.F. Gurish, R. Matsumoto, R.L. Stevens // *J. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 135. – P.279–290.

166. Galli S.J. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances / S.J. Galli, J. Kalesnikoff, M.A. Grimbaldston, A.M. Piliponsky, C.M. Williams, M. Tsai // *Annu. Rev. Immunol* – 2005. – Vol. 23. – P.749–786.
167. Wernersson S. Mast cell secretory granules: armed for battle. / S. Wernersson, G. Pejler // *Nat. Rev. Immunol* – 2014. – Vol. 14. – P.478–494.
168. Kovanen P.T. Mast cell granule-mediated uptake of low density lipoproteins by macrophages: a novel carrier mechanism leading to the formation of foam cells. / P.T. Kovanen // *Ann. Med* – 1991. – Vol. 23. – P.551–559.
169. Bararn D. Inhibitory effects of low molecular weight heparin on mediator release by mast cells: preferential inhibition of cytokine production and mast cell-dependent cutaneous inflammation. / D. Bararn, M. Rashkovsky, R. Hershkoviz, et al. // *Clin. Exper. Immunol* – 1997. – Vol. 110. – P.485–491.
170. Paananen K. Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules. / K. Paananen, P.T. Kovanen // *J Biol Chem* – 1994. – Vol. 269. – P.2023–2031.
171. Kaartinen M. Extracellular mast cell granules carry apolipoprotein B-100-containing lipoproteins into phagocytes in human arterial intima. Functional coupling of exocytosis and phagocytosis in neighbouring cells. / M. Kaartinen, A. Penttilä, P.T. Kovanen // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 1995. – Vol. 15. – P.2047–2054.
172. Kaartinen M. Extracellular mast cell granules carry apolipoprotein B-100-containing lipoproteins into phagocytes in human arterial intima. Functional coupling of exocytosis and phagocytosis in neighboring cells. / M. Kaartinen, A. Penttilä, P.T. Kovanen // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 1995. – Vol. 15. – P.2047–2205.
173. Lindstedt K.A. Inhibition of macrophage-mediated low density lipoprotein oxidation by stimulated rat serosal mast cells. / K.A. Lindstedt // *J Biol Chem* – 1993. – Vol. 268. – P.7741–7746.
174. Kelly J.L. The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease. / J.L. Kelly, D.S. Chi, W. Abou-Auda, J.K. Smith, G. Krishnaswamy // *Mol Med Today* – 2000. – Vol. 6. – P.304–308.
175. Krishnaswamy G. The human mast cell: an overview. / G. Krishnaswamy, O. Ajitawi, D.S. Chi // *Methods Mol Biol* – 2006. – Vol. 315. – P.13–34.
176. Kaartinen M. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase/chymase-containing mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder region of atheromas. / M. Kaartinen, A. Penttilä, P.T. Kovanen // *Arterioscler Thromb* – 1994. – Vol. 14. – P.966–972.
177. Johnson J.L. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. / J.L. Johnson, C.L. Jackson, G.D. Angelini, S.J. George // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 1998. – Vol. 18. – P.1707–1715.

178. Takai S. Functional role of chymase in angiotensin II formation in human vascular tissue. / S. Takai, N. Shiota, D. Jin, M. Miyazaki // *J Cardiovasc Pharmacol* – 1998. – Vol. 32. – P.826–833.
179. Richard V. Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. / V. Richard, S. Hurel-Merle, E. Scalbert, et al. // *Circulation* – 2001. – Vol. 104. – P.750–752.
180. Nakano A. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. / A. Nakano, F. Kishi, K. Minami, H. Wakabayashi, Y. Nakaya, H. Kido // *J Immunol* – 1997. – Vol. 159. – P.1987–1992.
181. Maguire J.J. Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1 - 31), in human mammary and coronary arteries in vitro. / J.J. Maguire, R.E. Kuc, A.P. Davenport // *Br J Pharmacol* – 2001. – Vol. 134. – P.1360–1366.
182. Lee M. Mast cell chymase degrades apoE and apoA-II in apoA-I-knockout mouse plasma and reduces its ability to promote cellular cholesterol efflux. / M. Lee, L. Calabresi, G. Chiesa, G. Franceschini, P.T. Kovanen // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 2002. – Vol. 22. – P.1475–1481.
183. Liao L. Role of mast cells in oxidized low-density lipoprotein-induced microvascular dysfunction. / L. Liao, D.N. Granger // *Am J Physiol* – 1996. – Vol. 271. – P.1795–1800.
184. Kinoshita M. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin8 production in human endothelial cells. / M. Kinoshita, M. Okada, M. Hara, Y. Furukawa, A. Matsumori // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 2005. – Vol. 25. – P.1858–1863.
185. Okayama Y. Mast cell matrix interactions. / Y. Okayama // *Clin Exp Allergy* – 2000. – Vol. 30. – P.455–457.
186. Oki T. Integrin alphaIIb beta3 induces the adhesion and activation of mast cells through interaction with fibrinogen. / T. Oki, J. Kitaura, K. Eto, et al. // *J Immunol* – 2006. – Vol. 176. – P.52–60.
187. Zhang J. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. / J. Zhang, P. Alcaide, L. Liu, J. Sun, A. He, F.W. Luscinskas, G.P. Shi // *PLoS One* – 2011. – Vol. 6, №1. – P.1–10.
188. Ihara M. Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta. / M. Ihara, H. Urata, A. Kinoshita, et al. // *Hypertension* – 1999. – Vol. 33. – P.1399–1405.
189. Bot I. Mast cells as effectors in atherosclerosis. / I. Bot, Guo-P. Shi, P.T. Kovanen // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2015. – Vol. 35, №2. – P.265–271.
190. Lappalainen J. OxLDL-IgG immune complexes induce expression and secretion of proatherogenic cytokines by cultured human mast cells. / J. Lappalainen, K.A. Lindstedt, R. Oksjoki, P.T. Kovanen // *Atherosclerosis* – 2011. – Vol. 214. – P.357–363.

191. Liao L. Molecular determinants of oxidized low-density lipoprotein-induced leukocyte adhesion and microvascular dysfunction. / L. Liao, R.M. Starzyk, D.N. Granger // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 1997. – Vol. 17. – P.437–444.
192. Meng Z. Oxidized low-density lipoprotein induces inflammatory responses in cultured human mast cells via Toll-like receptor 4. / Z. Meng, C. Yan, Q. Deng, X. Dong, Z.M. Duan, D.F. Gao, X.L. Niu // *Cell Physiol Biochem* – 2013. – Vol. 31. – P.842–853.
193. Oksjoki R. Receptors for the anaphylatoxins C3a and C5a are expressed in human atherosclerotic coronary plaques. / R. Oksjoki, P. Laine, S. Helske, P. Vehmaan-Kreula, M.I. Mäyränpää, P. Gasque, P.T. Kovanen, M.O. Pentikäinen // *Atherosclerosis* – 2007. – Vol. 195. – P.90–99.
194. Laine P. Evidence for complement activation in ruptured coronary plaques in acute myocardial infarction. / P. Laine, M.O. Pentikäinen, R. Würzner, A. Penttilä, T. Paavonen, S. Meri, P.T. Kovanen // *Am J Cardiol* – 2002. – Vol. 90. – P.404–408.
195. Laine P. Adventitial mast cells connect with sensory nerve fibers in atherosclerotic coronary arteries. / P. Laine, A. Naukkarinen, L. Heikkilä, A. Penttilä, P.T. Kovanen // *Circulation* – 2000. – Vol. 101. – P.1665–1669.
196. Lagraauw H.M. Vascular neuropeptide Y contributes to atherosclerotic plaque progression and perivascular mast cell activation. / H.M. Lagraauw, M.M. Westra, M. Bot, A. Wezel, P.J. van Santbrink, G. Pasterkamp, E.A. Biessen, J. Kuiper, I. Bot // *Atherosclerosis* – 2014. – Vol. 235. – P.196–203.
197. Wang Ke-Y. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein E knockout mice independently of serum cholesterol level. / Ke-Y. Wang, A. Tanimoto, X. Guo, S. Yamada, S. Shimajiri, Y. Murata, Y. Ding, M. Tsutsui, S. Kato, T. Watanabe, H. Ohtsu, Ken-I. Hirano, K. Kohno, Y. Sasaguri // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* – 2011. – Vol. 31, №4. – P.800–807.
198. Tanimoto A. Histamine network in atherosclerosis. / A. Tanimoto, Y. Sasaguri, H. Ohtsu // *Trends Cardiovasc Med* – 2006. – Vol. 16. – P.280–284.
199. Shore P.A. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. / P.A. Shore, A. Burkhalter, V.H. Cohn // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* november – 1959. – Vol. 127. – P.182–186.
200. Beer D.J. The influence of histamine on immune and inflammatory responses. / D.J. Beer, S.M. Matloff, R.E. Rocklin // *Adv. Immunol* – 1984. – Vol. 35. – P.209–268.
201. Li Y. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. / Y. Li, L. Chi, D.J. Stechschulte, K.N. Dileepan // *Microvasc. Res* – 2001. – Vol. 61, №3. – P.253–262.
202. Riley J.F. Histamine in tissue mast cells. / J.F. Riley // *Science* – 1953. – Vol. 118, № 3064. – P.332.

203. Kraehling J.R. Genome-wide RNAi Screen Reveals ALK1 Mediates LDL Uptake and Transcytosis in Endothelial Cells. / J.R. Kraehling, J.H. Chidlow, C. Rajagopal, M.G. Sugiyama, J.W. Fowler, M.Y. Lee, X. Zhang, et al. // *Nature Communications* – 2016. – Vol. 7. – P.1–15.
204. Ash A.S. Receptors mediating some actions of histamine. / A.S. Ash, H.O. Schild // *Br. J. Pharmacol. Chemother* – 1966. – Vol. 27, №2. – P.427–439.
205. Butterfield J.H. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. / J.H. Butterfield, D. Weiler, G. Dewald, G.J. Gleich // *Leukemia research* – 1988. – Vol. 12, № 4. – P.345-355.
206. Bauer J. In Vitro Model of Angiogenesis Using a Human Endothelium-Derived Permanent Cell Line: Contributions of Induced Gene Expression, G-proteins, and Integrins. / J. Bauer, M. Margolis, C. Schreiner, C.J. Edgell, J. Azizkhan, E. Lazarowski, R.L. Juliano // *J Cell Physiol* – 1992. – Vol. 153. – P.437–449.
207. Edgell C.J. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. / C.J. Edgell, C.C. McDonald, J.B. Graham // *Proc. Natl. Acad.* – 1983. – Vol. 80, №6. – P.3734–3737.
208. Nazarov P.G. C-reactive protein: Fc-gamma receptormediated effects on human peripheral blood basophils in vitro / P.G. Nazarov, A.P. Pronina, A.S. Trulioff // *C-Reactive Protein: New Research* / Ed. S. Nagasawa. – New York: Nova Science Publishers – 2009. – P.147–169.
209. Nazarov P.G. The influence of cholinergic agents on histamine release from HMC-1 human mast cell line stimulated with IgG, C-reactive protein and compound 48/80. / P.G. Nazarov, A.P. Pronina // *Life Sciences* – 2012. – Vol. 91. – P.1053–1057.
210. Monaghan-benson E. In vitro analyses of endothelial cell permeability. / E. Monaghan-benson, E.S. Wittchen // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 763. – P.281–290.
211. Havel R.J. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. / R.J. Havel, H.A. Eder, J.H. Bragdon // *Clin. Invest.* – 1955. – Vol. 34. – P.1345–1353.
212. Markwell M.A.K. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. / M.A.K. Markwell, S.M. Haas, L.L. Bieber, et al. // *Anal. Biochem* – 1978. – Vol. 87. – P.206-210.
213. Smith P.K. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. / P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk // *Anal. Biochem.* – 1985. – Vol. 150. – P.76-85.
214. Степанченко Н.С. Количественное определение содержания белка. / Н.С. Степанченко, Г.В. Новикова, И.Е. Мошков // *Физиология растений* – 2011. – Т.58, № 4. – С.624-630.
215. Пигаревский П.В. Иммуногистохимическое обнаружение модифицированных липопротеинов в атеросклеротических поражениях

- аорты человека. / П.В. Пигаревский, О.Ю. Архипова, А.Д. Денисенко // *Мед. иммунол.* – 2006. – Т.8, № 4. – С.637-644.
216. Chung K.W. The critical role played by endotoxin-induced liver autophagy in the maintenance of lipid metabolism during sepsis. / K.W. Chung, K.M. Kim, Y.J. Choi, H.J. An, B. Lee, D.H. Kim, E.K. Lee, E. Im, J. Lee, D.S. Im, B.P. Yu, H.Y. Chung // *Autophagy* – 2017. – Vol. 13. – P.1113–1129.
217. Трулев А.С. Влияние факторов острой фазы воспаления на взаимодействие тучных клеток с соединительной тканью. Взаимодействие тучных клеток человека линии НМС-1 с фибробластами. / А.С. Трулев, Н.А. Иванова, П.Г. Назаров // *Российский аллергологический журнал* – 2012. – Т. 1 – С.313–315.
218. Mogilenko D.A. Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. / D.A. Mogilenko, E.B. Dizhe, V.S. Shavva, I.A. Lapikov, S.V. Orlov, A.P. Perevozchikov // *Biochemistry* – 2009. – Vol. 48. – P.11950–11960.
219. Пронина А.П. Влияние факторов острой фазы воспаления на активацию базофилов и тучных клеток *in vitro*: автореф. дисс. канд. биол. наук: 14.03.09 / Пронина Анастасия Павловна – Санкт-Петербург, 2011. – 138 с.
220. Gao H. Rapamycin prevents endothelial cell migration by inhibiting the endothelial-to-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 and -9: an *in vitro* study. / H. Gao, J. Zhang, T. Liu, W. Shi // *Mol Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P.3406-3414.
221. Hough G.P. Transport of low density lipoproteins across endothelial monolayers. / G.P. Hough, L.A. Ross, M. Navab, A.M. Fogelman // *European Heart Journal* – 1990. – Vol. 11. – P.62-71.
222. Wang Y. Analysis of endothelial barrier function *in vitro*. / Y. Wang, J. Steven // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 763. – P.253-264.
223. Gryczynski Z. Practical Fluorescence Spectroscopy. / Z. Gryczynski, I. Gryczynski // CRC Press – 2019. – 792 p.
224. Czajkowsky D.M. The Human IgM Pentamer Is a Mushroom-Shaped Molecule With a Flexural Bias. / D.M. Czajkowsky, Z. Shao // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2009. – Vol. 106, №35. – P.14960–14965.
225. Kim M.J. Transendothelial transport of modified low-density lipoproteins. / M.J. Kim, J. Dawes, W. Jessup // *Atherosclerosis* – 1994. – Vol. 108. – P.5–17.
226. Schatzmann H.J. Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. / H.J. Schatzmann // *Helv.Physiol. Pharmacol.* – 1953. – P.346–354.
227. Rincon-Heredia R. Ouabain induces endocytosis and degradation of tight junction proteins through ERK1/2-dependent pathways. / R. Rincon-Heredia, D. Flores-Benitez, C. Flores-Maldonado, J. Bonilla-Delgado, V. García-Hernández, O. Verdejo-Torres, A.M. Castillo, I. Larré, A.C. Poot-

- Hernández, M. Franco, P. Gariglio, J.L. Reyes, R.G. Contreras // *Experimental Cell Research* – 2014. – Vol. 320. – P.108–118.
228. Dutta D. Search for inhibitors of endocytosis. Intended specificity and unintended consequences. / D. Dutta, J.G. Donaldson // *Cellular Logistics 2* – 2012. – Vol. 4. – P.203–208.
229. Wang L.H. Misassembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. / L.H. Wang, K.G. Rothberg, R.G. Anderson // *J Cell Biol* – 1993. – Vol. 123. – P.1107–1117.
230. Elkin S.R. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. / S.R. Elkin, A.M. Lakoduk, S.L. Schmid // *Wien Med Wochenschr* – 2016. – Vol. 166. – P.196–204.
231. Mukherjee S. Endocytosis. / S. Mukherjee, R.N. Ghosh, F.R. Maxfield // *Physiological Reviews* – 1997. – Vol. 77, №3. – P.759–803.
232. Predescu S.A. Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. / S.A. Predescu, D.N. Predescu, A.B. Malik // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2007. – Vol. 293. – P.823–842.
233. Singh R.D. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. / R.D. Singh, V. Puri, J.T. Valiyaveetil, D.L. Marks, R. Bittman, R.E. Pagano // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – Vol. 14. – P.3254–3265.
234. Kleemann R. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. / R. Kleemann, S. Zadelaar, T. Kooistra // *Cardiovascular Research* – 2008. – Vol. 79. – P.360–376.
235. Yong Y.K. Bixa orellana leaf extract suppresses histamine-induced endothelial hyperpermeability via the PLC-NO-cGMP signaling cascade. / Y.K. Yong, H.S. Chiong, M.N. Somchit, Z. Ahmad // *BMC Complement Altern Med.* – 2015. – Vol. 15. – P.356.
236. Takeda T. Histamine decreases the permeability of an endothelial cell monolayer by stimulating cyclic AMP production through the H₂-receptor. / T. Takeda, Y. Yamashita, S. Shimazaki, Y. Mitsui // *Journal of Cell Science* – 1992. – Vol. 101. – P.745–750.
237. Kenakin T. Principles: receptor theory in pharmacology. / T. Kenakin // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2004. – Vol. 25. – P.186–192.
238. Stochla K. Substance 48/80 and experimental inflammation. / K. Stochla // *Acta Physiol Pol* – 1980. – Vol. 31. – P.535–543.
239. Schemann M. The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. / M. Schemann, E.M. Kugler, S. Buhner, C. Eastwood, J. Donovan, W. Jiang, D. Grundy // *PLoS One* – 2012. – Vol. 7. – P.1–9.
240. Esposito B. NAADP links histamine H₁ receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells. / B. Esposito, G. Gambarà, A.M. Lewis, F. Palombi, A. D'Alessio, L.X. Taylor, A.A. Genazzani, E. Ziparo, A. Galione, G.C. Churchill, et al. // *Blood* – 2011. – Vol. 117. – P.4968–4977.

241. Vreugdenhil A.C. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. / A.C. Vreugdenhil, A.M. Snoek, C. Veer, J.W. Greve, W.A. Buurman // Clin Invest. – 2001. – Vol. 107, №2. – P.225–234.
242. Yosef E. Do Src Kinase and Caveolin Interact Directly with Na, K-ATPase? / E. Yosef, A. Katz, Y. Peleg, T. Mehlman, S.JD. Karlsh // J Biol Chem. – 2016. – Vol. 291, №22. – P.11736–11750.