

*На правах рукописи*

**Цитрина Александра Андреевна**

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКЗОЦИТОЗА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА В  
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ**

03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Научный руководитель:** **АВДОНИН Павел Владимирович**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией физиологии  
рецепторов и сигнальных систем Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
науки Институт биологии развития им. Н.К.  
Кольцова РАН (г. Москва)

**Официальные оппоненты:** **МАЗУРОВ Алексей Владимирович**  
доктор медицинских наук, профессор, главный  
научный сотрудник, и. о. заведующего  
лабораторией клеточной адгезии Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (г. Москва)

**ЕРОХИНА Мария Владиславовна**  
доктор биологических наук, доцент кафедры  
клеточной биологии и гистологии Федерального  
государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В.  
Ломоносова» (г. Москва)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт цитологии  
Российской академии наук (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в 14.00 часов на заседании  
диссертационного совета Д 002.238.02 в Институте биологии развития им. Н.К.  
Кольцова РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте  
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, <http://idbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года.

Учёный секретарь диссертационного  
совета, кандидат медицинских наук

Кузнецова А.В.  
[avkuzn@idbras.ru](mailto:avkuzn@idbras.ru)

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и современное состояние проблемы.** Эндотелиальные клетки (ЭК), выстилающие просвет кровеносных и лимфатических сосудов, играют ключевую роль в таких важных процессах как гемостаз, контроль тонуса кровеносных сосудов, воспаление, регенерация и ангиогенез. ЭК продуцируют NO -ключевой вазодилататор, а также факторы, необходимые для инициации реакции гемостаза (фактор Виллебранда) и воспаления (P-селектин) [Esper и др., 2006]. Фактор Виллебранда и P-селектин представляют собой сложные белковые молекулы, синтезирующиеся и накапливающиеся внутриклеточно в специализированных везикулах – тельцах Вейбеля-Паладе (ТВП) [Metcalf и др., 2008]. ТВП – это уникальные секреторные органеллы сигарообразной формы, характерные только для эндотелиальных клеток и играющие центральную роль в инициации реакции гемостаза и воспаления. Экзоцитоз содержимого ТВП строго контролируется и регулируется клетками в зависимости от условий внешней среды. Так, при активации реакции гемостаза происходит выброс преимущественно «длинных» ( $> 2$  мкм) ТВП, содержащих до 80% всего внутриклеточного пула ФВ, который под действием гидростатических сил, формирует специфические структуры – «струны» на поверхности ЭК. «Струны» инициируют адгезию и активацию тромбоцитов и запускают тромбогенез. При стимуляции воспалительными медиаторами, такими как липополисахариды бактерий, секретируются преимущественно «короткие» ( $< 2$  мкм) ТВП, чье содержимое усиливает адгезию лимфоцитов к эндотелию и активирует иммунные клетки [Nightingale и др., 2018]. Описан механизм частичного экзоцитоза ТВП, при котором ФВ остается внутри везикулы, а низкомолекулярные вещества выходят наружу [Babich и др., 2008]. Можно сказать, что молекулярные механизмы, регулирующие генерацию и экзоцитоз ТВП, определяют пластичность эндотелия и опосредуют переключение между воспалительным и гемостатическим режимом функционирования ЭК [Ferraro и др., 2016; Nightingale и др., 2018]. Изучение этих путей регуляции представляет собой фундаментальную задачу.

Концепция о сигнальной роли активных форм кислорода широко обсуждается в литературе. Эндогенные АФК задействованы в регуляции всех аспектов биологии клетки наряду с кальцием и сАМФ. Источниками АФК в ЭК могут быть ферменты дыхательной цепи митохондрий, ксантиноксидаза, оксигеназы арахидоновой кислоты и разобщенная NO-синтаза, которые производят  $O_2^-$  [Cai, 2005; Craige, Kant, Keaney, 2015]. В норме, основными продуцентами АФК в клетках являются NADPH-оксидазы (Nox), уникальные ферменты, основной функцией которых является перенос электрона через липидный бислой с молекулы NAD(P)H на молекулу  $O_2$ . Nox оксидазы – основные регуляторы окислительно-восстановительного сигнального пути в ЭК и, в зависимости от изоформы и набора регуляторных субъединиц, продуцируют  $O_2^-$  или  $H_2O_2$  [Cave и др., 2006].  $O_2^-$  может взаимодействовать с NO либо разлагается с образованием  $H_2O_2$  под действием супероксиддисмутазы [Cai, 2005]. По данным Augsburgер с соавторами,  $H_2O_2$  является преобладающей

внутриклеточной формой АФК [Augsburger и др., 2019]. Имеющиеся в литературе данные позволяют сказать, что  $H_2O_2$  является вторичным мессенджером, который задействован во множестве сигнальных путей [Cai, 2005] и регулирует все аспекты биологии ЭК. Усиленная продукция АФК вносит весомый вклад в развитие патологического процесса и оказывает негативное влияние на эндотелий, снижая продукцию NO и увеличивая секрецию фактора Виллебранда и Р-селектина на клеточную поверхность [Thomas, Witting, Drummond, 2008]. В то же время, роль низких, физиологических концентраций АФК, в первую очередь  $H_2O_2$ , описана в литературе фрагментарно [Cai, 2005]. Данных об участии  $H_2O_2$  в регуляции экзоцитоза ТВП крайне мало, в литературе обнаруживается лишь одна публикация, посвященная этому вопросу [Matsushita и др., 2005]. Поэтому, целью данной работы было изучение влияния экзогенной  $H_2O_2$ , а также агонистов, усиливающих продукцию внутриклеточных АФК, на процесс экзоцитоза ТВП и секрецию ФВ на поверхность ЭК. В качестве таких агонистов, были выбраны биогенные амины гистамин [Hu и др., 2002] и серотонин [Avdonin и др., 2019], и три ключевых цитокина: VEGF, TGF-beta и TNF-alpha, регулирующих рост, дифференцировку и воспалительный ответ эндотелия [Li и др., 2005; Mohamed и др., 2020; Monaghan-Benson, Burrridge, 2009]. Для того, чтобы достичь поставленной цели необходимо было разработать метод количественной оценки экзоцитоза ТВП на поверхность ЭК, который бы учитывал модальность (гемостатическая или воспалительная) реакции эндотелия.

**Цели и задачи исследования.** Целью данного исследования было изучение влияния экзогенной перекиси водорода, а также агонистов продукции эндогенных активных форм кислорода на процесс экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе и секрецию фактора Виллебранда в эндотелиоцитах.

#### **Задачи:**

1. Разработать метод регистрации количества событий экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе на поверхность эндотелиоцитов.
2. Оценить влияние экзогенно добавленной  $H_2O_2$  на экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе и секрецию фактора Виллебранда.
3. Оценить возможную роль ферментов синтеза АФК в гистамин-индуцированном экзоцитозе фактора Виллебранда из телец Вейбеля-Паладе.
4. Исследовать влияние активации 5-HT<sub>1B/2B</sub>-рецепторов на экзоцитоз фактора Виллебранда из телец Вейбеля-Паладе.
5. Провести сравнительное исследование факторов роста и цитокинов на экзоцитоз фактора Виллебранда из телец Вейбеля-Паладе.

**Научная новизна исследования.** В ходе выполнения данной работы был разработан оригинальный количественный метод оценки активации экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе, основанный на иммуноцитохимической детекции

основного их содержимого – фактора Виллебранда. Разработанный подход позволяет проводить точную количественную оценку изменений поверхности ЭК под действием тех или иных веществ. С помощью данного метода впервые показано, что физиологически релевантная концентрация  $H_2O_2$  стимулирует экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе и образование тромбогенных мультимерных «струн» фактора Виллебранда на поверхности ЭК. В то же время, впервые продемонстрирована роль NADPH-оксидаз в гистамин-индуцированном ответе ЭК, более того, впервые показано, что ингибирование активности NADPH-оксидаз угнетает не только индуцированную, но и базальную секрецию ТВП и фактора Виллебранда. Впервые описано изменение поверхности ЭК в ответ на стимуляцию 5-HT<sub>1B</sub> и 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов. Полученные данные говорят о том, что 5-HT сигнальный каскад вовлечен преимущественно в реализацию воспалительного ответа ЭК. Также впервые проведено сравнительное исследование влияния трех цитокинов, регулирующих рост, пролиферацию, миграцию и воспалительный ответ ЭК. Показано, что стимуляция эндотелиоцитов с помощью VEGF приводила к усилению базальной секреции фактора Виллебранда из телец Вейбеля-Паладе, в то время как TGF-beta и TNF-alpha подавляют экзоцитоз ТВП.

**Практическая значимость.** Разработанный в ходе выполнения данной работы метод позволяет проводить быструю и точную оценку влияния различных веществ на состояние ЭК и не требует наличия дорогого узкоспециализированного оборудования, что может существенно облегчить поиск и описание новых лекарственных средств для коррекции эндотелиальной дисфункции. Выявлены новые данные о связи окислительного стресса и усиленного экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе и фактора Виллебранда из ЭК. Эти результаты вносят вклад в понимание патогенеза тромботических микроангиопатий, в основе которых лежит нарушение обмена этого фактора свёртывания крови. Более того, особую актуальность полученные данные приобретают в условиях пандемии короновиральной инфекции. Последние клинические данные напрямую связывают тяжесть течения болезни, вызванной COVID-19, с уровнем фактора Виллебранда в крови зараженных [Aksenova, 2020]. Показано, что стимуляция 5-HT рецепторов ЭК активирует провоспалительный путь экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе, эти данные необходимо учитывать при использовании фармакологических препаратов, являющихся лигандами этих рецепторов. В настоящей работе показано участие NADPH-оксидаз в вызываемой гистамином секреции ФВ. Это свидетельствует о том, что NADPH-оксидазы могут служить новой, ранее неизвестной мишенью для поиска новых антигистаминных фармакологических препаратов, которые могут быть использованы для предотвращения тромбоза глубоких вен, инициируемого гиперсекрецией гистамина тучными клетками [Ronomayou и др., 2017] Более того, возможность использования VAS2870 и других ингибиторов NADPH-оксидаз для коррекции ряда патологических состояний обсуждается в литературе [Ma и др., 2018], а полученные результаты расширяют спектр их возможного применения.

## **Положения, выносимые на защиту.**

1. Перекись водорода является физиологическим активатором экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе, ее воздействие активирует формирование тромбогенных «струн» полимерного фактора Виллебранда на поверхности эндотелиальных клеток.
2. NADPH-оксидазы вовлечены в реализацию ответа эндотелиальных клеток на гистамин, в том числе, в экзоцитоз фактора Виллебранда.
3. Активация 5-HT рецепторов эндотелиальных клеток стимулирует экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе и фактора Виллебранда по воспалительному типу.
4. Воздействие ростовых факторов TGF-beta и TNF-alpha подавляет базальную секрецию телец Вейбеля-Паладе и фактора Виллебранда, в то время как VEGF стимулирует его.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием стандартизированных методик и протоколов, качественных реактивов и материалов. Все эксперименты проведены со всеми надлежащими техническими контролями и биологическими повторами. Полученные данные обрабатывались соответствующими статистическими методами. Основные материалы, изложенные в диссертации, были доложены и обсуждены на 2 конференциях: конференция с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем» посвященная 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева. Москва, 23-25 октября 2018 г; Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Пущино, 22-25 мая 2017 г.

**Перечень публикаций.** По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работ, из них в журналах, соответствующих перечню ВАК – 4 (в том числе статей в иностранных журналах – 2), тезисов докладов и материалов конференций – 2.

**Личный вклад автора.** Все разделы диссертации были написаны лично автором или при его непосредственном участии. Описанный в данной работе метод детекции экзоцитоза фактора Виллебранда был разработан лично автором. Автором выполнялись все экспериментальные процедуры, фиксация, иммунохимическое окрашивание, микроскопическая съемка и обработка полученных изображений, а также иммуноферментный анализ. Статистический анализ полученных данных также проводился лично автором.

**Структура и объем диссертации.** Текст диссертации приведен на 153 страницах, содержит 32 рисунка, 9 таблиц и дополнен 1 приложением. В работе процитирован 191 литературный источник

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культура клеток HUVEC и условия стимуляции.** Клетки выращивали в культуральных флаконах T-25, предварительно покрытых 0,1% желатином, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование проводили с помощью фермента аккутазы (SigmaAldrich, США). В работе использовали клетки 2–4 пассажей. Для проведения эксперимента, эндотелиоциты выращивали 24 или 48 луночном планшете до достижения 100% плотности культуры. Эксперименты проводили на зрелых (2 дня после достижения 100% плотности) монослойных культурах. ЭК отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (PSS, pH 7.4), содержащим NaCl (145 mM), KCl (5 mM), HEPES (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), глюкозу (10 mM). Далее, ЭК инкубировали в течение 30-60 мин в растворе PSS при 30°C. Объем среды инкубации составлял 150 мкл. Для стимуляции экзоцитоза ФВ использовали вещества, перечисленные в Табл.1.

**Количество растворимого ФВ измеряли методом ELISA** с помощью коммерческого набора «TechnozymvWF:Ag ELISA» (TechnocloneGmbH, Австрия) согласно рекомендациям производителя.

**Проникновение экзогенно добавленной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> внутрь ЭК** регистрировали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин-диацетата (H2DCF-DA). Изменения флуоресценции зонда регистрировали с помощью микропланшетного спектро-флуориметра Synergy 4 (BioТес, США). Измерения проводили при температуре 25°C, одновременно с 12 лунок, при спектре возбуждения 485±20 нм и эмиссии 527±15 нм. Для оценки степени зависимости флуоресценции зонда от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> использовали метод линейной регрессии. Для оценки качества модели использовали R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации. R<sup>2</sup> принимает значения от 0 до 1, где 0 – обозначает отсутствие зависимости между двумя показателями; чем значение коэффициента ближе к 1, тем сильнее взаимосвязь между переменными.

**Оценка количества мембран-ассоциированного ФВ осуществлялась методами иммуногистохимии и флуоресцентной микроскопии.** Для этого, ЭК фиксировали 4%PFA в PBS pH 7.4 в течении 20 минут на льду, а затем отмывали PBS-1% BSA 3 раза по 15 мин. Первичные антитела к ФВ (Rabbit anti-human vWF Cat # A0082, Dako, Франция) наносили в растворе PBS-1%BSA в разведении 1:500 и оставляли инкубироваться на ночь при +4 °C. Затем ЭК промывали 0,5 мл раствора PBS-1%BSA, 3 раза по 15 мин и инкубировали в смеси вторичных антител (goat anti-rabbit AlexaFluor 647 Cat # A21071, либо goat anti-rabbit AlexaFluor 488 Cat# A-11008, Invitrogen, в разведении 1:1000 ) и лектина из проростков пшеницы WGA (weat germ agglutinin AlexaFluor 488 Cat # W11261 либо, WGA AlexaFluor 594 Cat# W11262, Invitrogen в разведении 1:500) 1 час при комнатной температуре. Несвязавшиеся антитела отмывали 0,5 мл раствора PBS-1% BSA 3 раза, по 15 минут. Препараты докрашивали 10 минут красителем Hoechst 33258 (Cat# 861405, Sigma Aldrich) в концентрации 1 мкг/мл в PBS и заключали в пересыщенный раствор фруктозы. Готовые препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 (Leica,

Germany). Параметры захвата изображения настраивались по самому яркому образцу и не менялись в течение всего эксперимента. С центрального участка каждой лунки снимался мозаичный кадр величиной в 25 микроскопических полей и имеющий физические размеры 1,5х 2 мм. Съемка велась с использованием высокоскоростного адаптивного автофокуса. С каждого образца получали 25 изображений, содержащих 3 флуоресцентных канала, с кодировкой глубины цвета 8 бит.

**Табл.1**

Вещество	Растворитель	Концентрация, время экспозиции	Мишень
BW-723C86	DMSO,PSS	30 мкМ, 30 мин 100 мкМ, 30 мин	5-HT2B агонист
CGS-12066A	DMSO, PSS	50 мкМ, 30 мин	5-HT1B агонист
Гистамин	PSS	100 мкМ, 30 мин	Агонист HR1/2
TGF-beta	PSS	10 нг/мл, 30-60 мин	Агонист рецепторных тирозинкиназ
VEGF	PSS	10 нг/мл, 30-60 мин	Агонист рецепторных тирозинкиназ
TNF alpha	PSS	10 нг/мл, 30-60 мин	Активатор продукции АФК
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PSS	100 мкМ, 30 мин	
VAS2870	DMSO. PSS	10 мкМ, 5 мин	Ингибитор NADPH-оксидаз

**Сегментация изображения с помощью CellProfiler 3.0.** Полученные 75 кадров каждой мозаики (3 канала х 25 кадров) конвертировали в черно-белые изображения в формате TIFF, которые анализировали с помощью программы CellProfiler, имеющейся в открытом доступе. Общий вид алгоритма анализа и результат его работы подробно описан далее и представлен на Рис.1. В финальный анализ вошли следующие параметры: интегральная интенсивность клетки и отдельной ФВ-положительной структуры, краевая интегральная интенсивность клетки и количество ФВ-позитивных структур.

**Краевой коэффициент E.** Рассчитывался только для тех экспериментов, где количество событий экзоцитоза равнялось или превышало таковой показатель для контрольных клеток. Представляет собой модуль отношения изменения медианной краевой интегральной интенсивности клетки к изменению медианной интегральной интенсивности клетки, рассчитанных в процентном отношении к контролю.

$$E = \left| \frac{\Delta \text{медианной краевой интегральной интенсивности клетки, \%}}{\Delta \text{медианной интегральной интенсивности клетки, \%}} \right|$$



Получившийся коэффициент является безразмерной величиной, изменяющейся в диапазоне от 0 до  $+\infty$ . Весь диапазон значений этого коэффициента можно разбить на 2 группы:  $E = (0;1)$  -изменение медианной интегральной интенсивности превосходят изменения краевой интегральной интенсивности клетки, что говорит о тромботическом характере экзоцитоза;  $E = (1; +\infty)$  изменения медианной краевой интегральной интенсивности превосходят изменения общей интегральной интенсивности клетки, что говорит о воспалительном характере экзоцитоза.

### **Статистическая обработка данных и анализ сходимости результатов**

Полученные данные экспортировались в формате csv и обрабатывались отдельно с помощью GraphPadPrism 8.0. Размер выборки для каждой экспериментальной группы составлял порядка 10 000 значений. Т.к. распределение данных не подчинялось нормальному закону, для анализа мы использовали следующие статистические показатели: 25 перцентиль, медиану и 75 перцентиль. Для оценки уровня достоверности наблюдаемых различий использовались непараметрические критерии Крускала-Уоллиса (для множественных сравнений) и Мана-Уитни (для сравнения двух групп). Различия между группами считались значимыми при  $p < 0.01$ . Полученные результаты представлены двумя типами графиков диаграммой «ящик с усами» и гистограммой распределения. Количество повторных экспериментов по оценке влияния индивидуальных веществ приведены в Табл. 2. Эксперименты, вошедшие в финальный анализ, отбирали по критерию ответа на 100 мкМ гистамина. Для оценки влияния индивидуальных веществ на параметры клетки использовали точный критерий Фишера. Для этого, количественные показатели ответа ЭК были переведены в факторный вид по характеру ответа в сравнении с контролем. В случае с BW, также учитывались показатели разности по медианному количеству точек и их яркости между двумя концентрациями BW (30 мкМ и 100 мкМ).

**Табл. 2**

Вещество	Количество экспериментов, использованных в анализе	Общее количество экспериментов
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	4
Гистамин	10	11
BW-723C86	10	12
CGS-12066A	5	5
Факторы роста	4	4
VAS2870	1	1

В результате такого преобразования получали факторную таблицу сопряженности, которая описывала распределение изучаемых признаков (изменения медианного количества точек на клетку и их медианной яркости) в

выборке из нескольких повторных экспериментов для одного изучаемого вещества. При помощи точного критерия Фишера оценивалась вероятность получить такие же или еще более выраженные различия в распределении наблюдаемых признаков по сравнению с нулевой гипотезой, которая предполагает, что вещество никак не влияет на изучаемые параметры клеток. Все расчеты проводили с помощью программного пакета RStudio 1.2.5003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

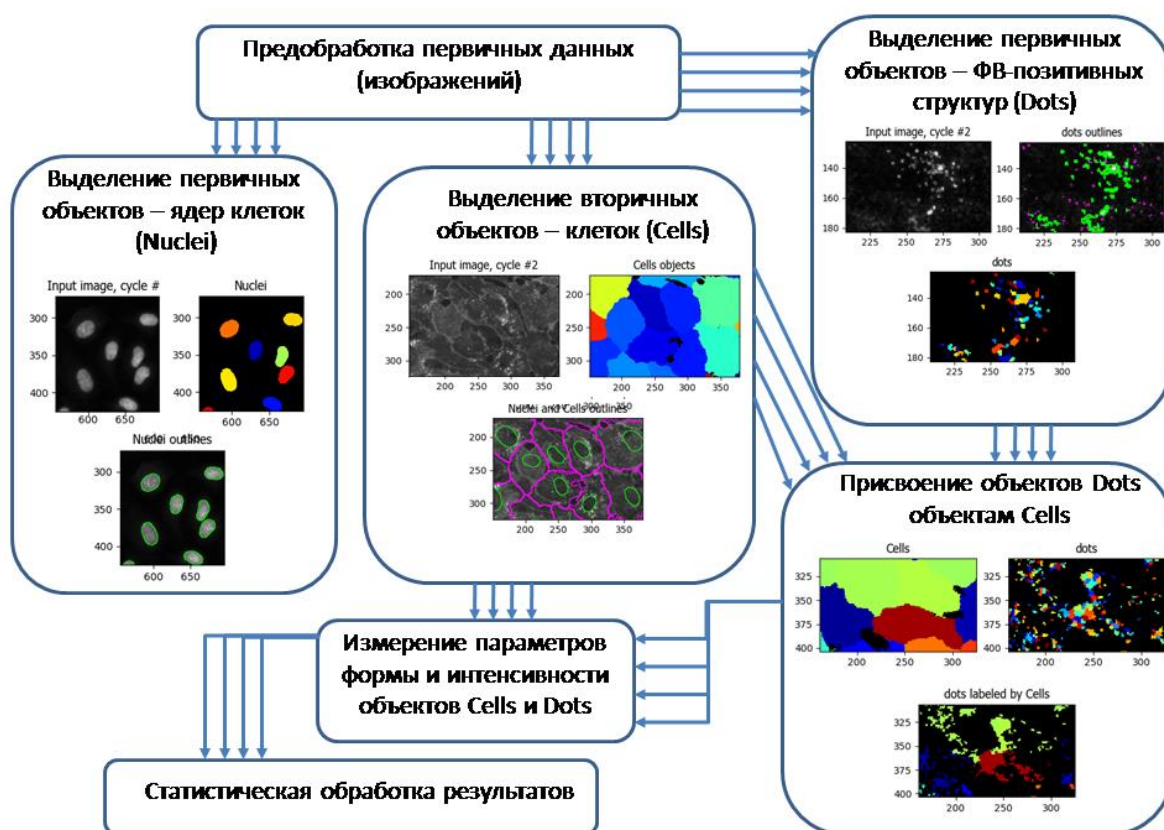
В результате трехлетней работы, было задокументировано 20 экспериментов, общим объемом 50 Гб. Семнадцать из них было отобрано для анализа. Три эксперимента были исключены по причине неудовлетворительного фенотипа ЭК, по критериям описанным выше.

Весь набор полученных изображений сегментировали с помощью программного пакета с открытым исходным кодом CellProfiler 3.0. Сегментацию проводили по следующему алгоритму (Рис.1):

1. Детекция ядер (класс объектов Nuclei) отдельных клеток по каналу флуоресценции ядерного красителя Hoechst 33542.
2. Детекция границ отдельных клеток и выделение класса объектов Cells по каналу флуоресценции красителя WGA.
3. Детекция ФВ-позитивных структур и выделение класса объектов Dots по каналу флуоресценции антител против ФВ.
4. Соотнесение объектов класса Dots с объектами класса Cells.
5. Измерение интегральной интенсивности флуоресценции ФВ внутри полученных объектов обоих классов.

Конечный результат анализа для каждого эксперимента был выведен в виде файлов формата csv, содержащих порядка 20 параметров, характеризующих интенсивность каждого из изученных объектов. Для дальнейшего статистического анализа мы отобрали три наиболее значимых параметра, а именно: **Интегральная интенсивность** клетки и отдельной ФВ-положительной структуры. Интегральная интенсивность представляет собой сумму интенсивностей всех пикселей изображения, входящих в состав отдельного объекта. Интенсивность одного пикселя изменяется в пределах от 0 до 1. **Краевая интегральная интенсивность** клетки представляет собой интенсивность всех пикселей, очерчивающих клетку. **Количество ФВ-позитивных структур** (дочерних объектов класса Dots), принадлежащих клетке (объекту из класса Cells).

Интенсивность флуоресценции отражает степень доступности антигена ФВ, находящегося на поверхности клеток, для антител. Дальнейший анализ экспериментов позволяет разбить их все на две большие группы по характеру изменения количества событий экзоцитоза и их интегральной интенсивности. Стимуляция секреции ФВ – количество событий экзоцитоза не изменялось либо повышалось по сравнению с контролем, их интегральная интенсивность росла; Подавление базальной секреции. Характеризуется снижением количества ФВ-позитивных структур и их интегральной интенсивности.

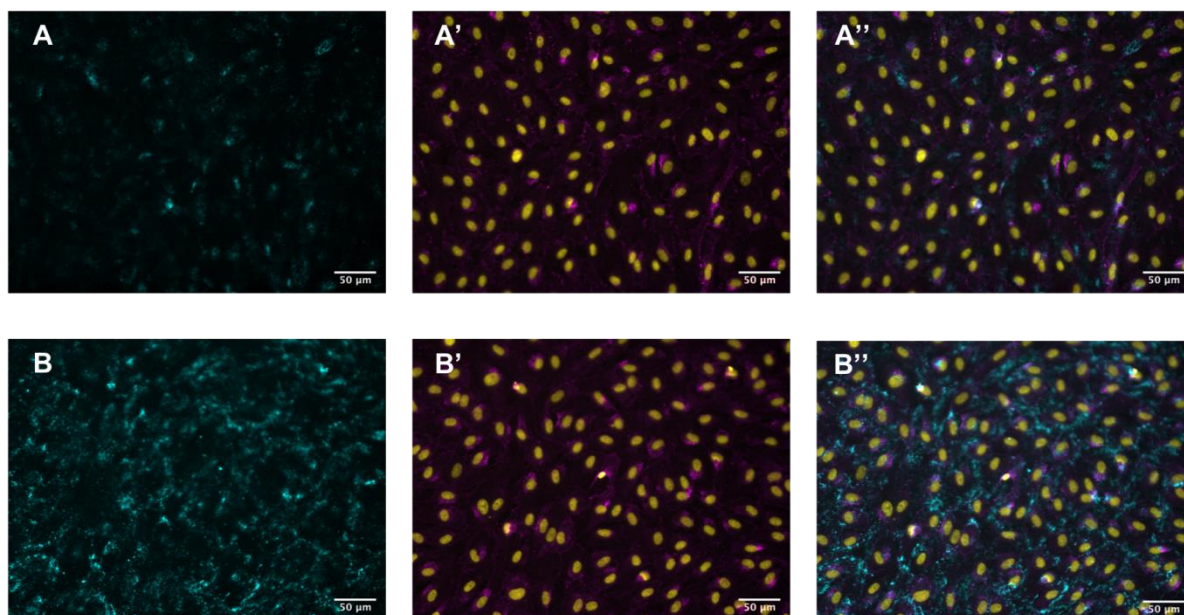


**Рис.1.** Алгоритм сегментации изображений и результаты его работы.

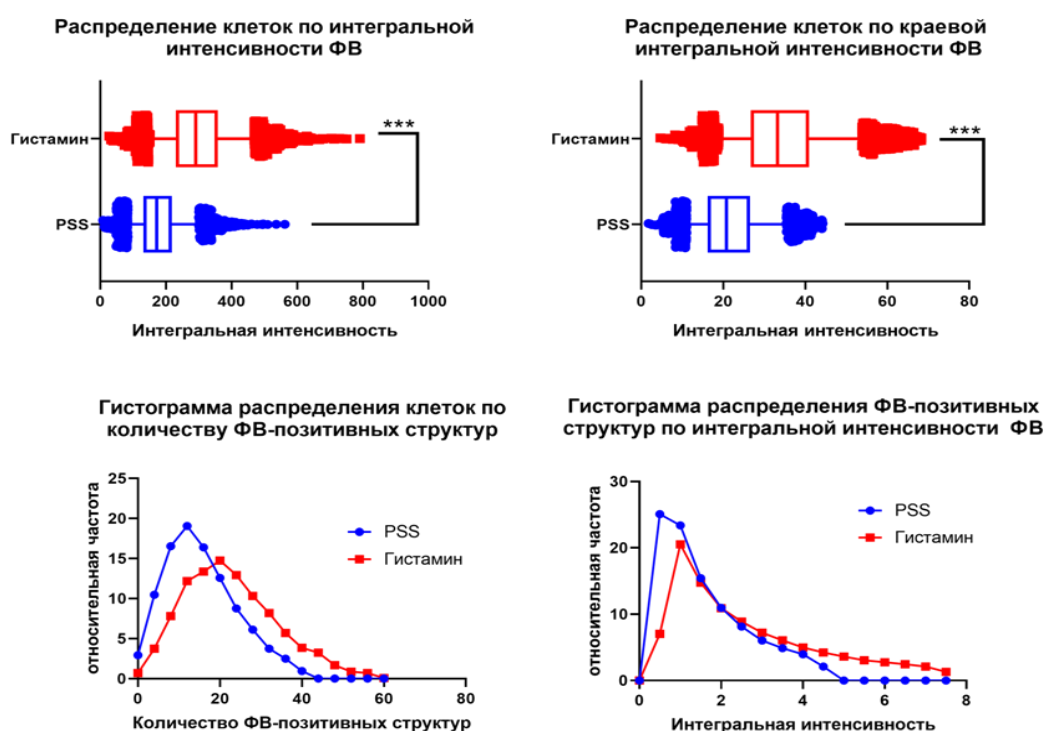
В случае стимуляции секреции ФВ мы также охарактеризовали тип изменения клеточной поверхности. Для того, чтобы оценить вклад изменений клеточной поверхности по границам клеток, мы ввели краевой коэффициент  $E$ , который маркирует гемостатический ( $E < 1$ ) и воспалительный ( $E > 1$ ) тип экзоцитоза.

### **Оценка влияния гистамина на фенотип ЭК.**

После 30 минутной стимуляции 100 мкМ гистамина, мы наблюдали значительное увеличение экспонирования ФВ на поверхности клеток (Рис.2,3). Сегментация изображения и последующий статистический анализ получившихся объектов показал, что стимуляция 100 мкМ гистамина приводит к значительному увеличению интегральной интенсивности клетки по ФВ. Медианное значение краевой интегральной интенсивности возрастало на 60%, а общей интегральной интенсивности клетки – на 70% по сравнению с контрольными клетками. Медианное количество ФВ-позитивных структур, представленных на поверхности ЭК, увеличивалась на 50%, а их медианная интегральная интенсивность возрастала на 15% (Рис.3) по сравнению с контрольными значениями.



**Рис.2** Экспонирование ФВ(А, В) на поверхности контрольных (А-А'') и стимулированных 100 мкМ гистамина, ЭК. Фактор Виллебранда (А,В), границы клеток, окрашенные лектином WGA и ядра клеток, окрашенные Hoechst 33258 (А',В'), наложение (А'',В''). Шкала 50 мкм.



**Рис.3** Параметры интенсивности клеток и ФВ-положительных структур при действии 100 мкМ гистамина. Число независимых лунок для каждой экспериментальной группы  $n=3$ , \*\*\* -  $p<0.001$ . Для анализа использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса.

Анализ 10 независимых экспериментов по воздействию гистамина на ЭК с позволил сформировать следующую таблицу (Табл.3). Стимуляция ЭК с

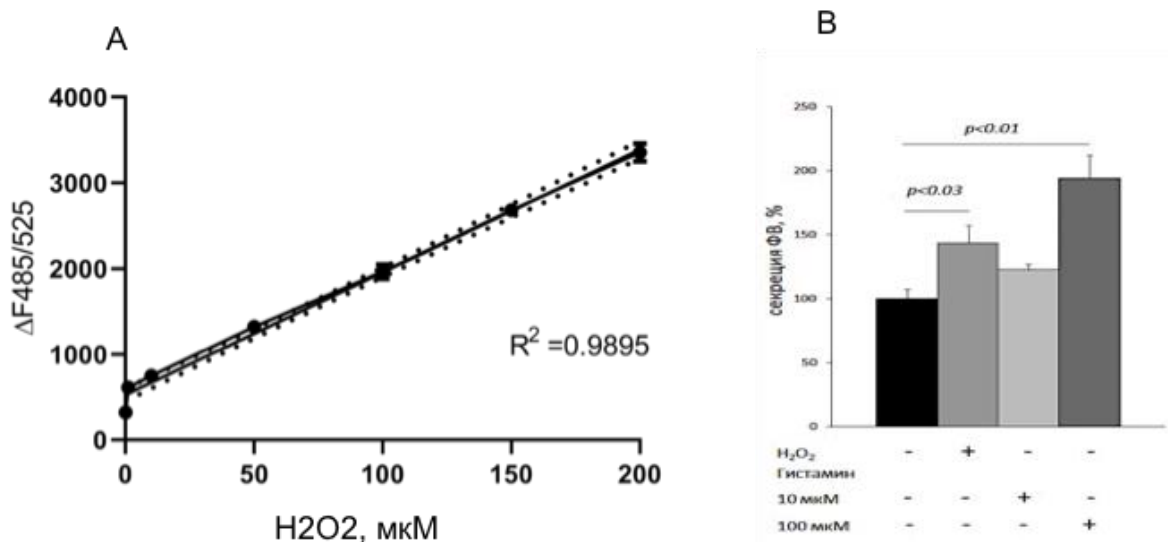
помощью гистамина увеличивала количество событий экзоцитоза и их интегральную интенсивность, медианный коэффициент E не превышал 1, что говорит о тромботическом характере изменений клеточной поверхности, что в целом согласуется с литературными данными.

Табл.3

	Уменьшается	Не меняется	Увеличивается	p value
Медианное количество структур на клетку	2	1	7	<b>1.083e-05</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	1	0	9	<b>1.083e-05</b>
Медианный коэффициент E				<b>0,86</b>

### Оценка влияния $H_2O_2$ на экзоцитоз ФВ.

При добавлении  $H_2O_2$  к ЭК наблюдается линейное увеличение флуоресценции зонда  $H_2DCF$ -DA, пропорциональное концентрации пероксида, что свидетельствует о его проникновении внутрь клетки (Рис.4А).

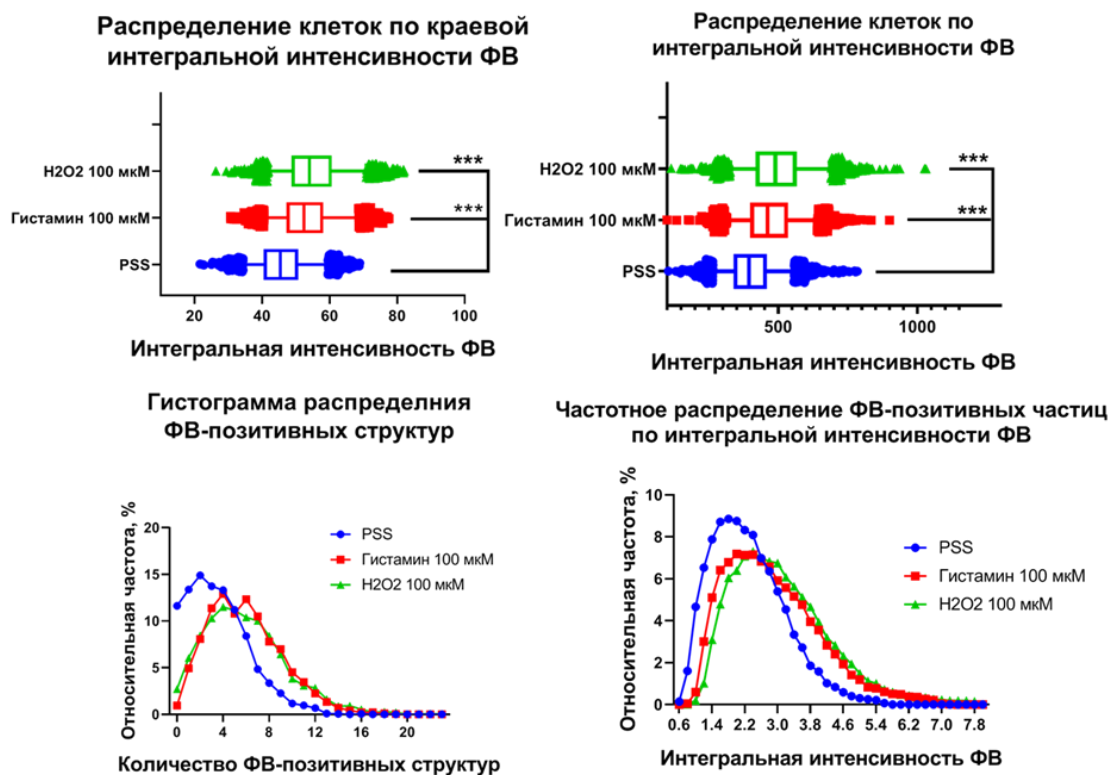


**Рис.4.** А-Увеличение флуоресценции дихлорфлуоресцеина под действием различных концентраций  $H_2O_2$ ,  $R^2$  – коэффициент детерминации. В - Секреция ФВ в культуральную среду при стимуляции гистамином и  $H_2O_2$ . Данные приведены в виде  $mean \pm SD$  и представляют собой результат 3 независимых экспериментов

**Влияние экзогенной  $H_2O_2$  на секрецию ФВ** оценивали методом ELISA. В качестве контроля, были взяты две концентрации гистамина: 10 мкМ и 100 мкМ. В присутствии 100 мкМ  $H_2O_2$  содержание в культуральной среде растворимого ФВ увеличивается на  $43 \pm 13\%$  по сравнению с контрольными клетками. Обнаруженный эффект действия  $H_2O_2$  вдвое меньше аналогичного эффекта 100 мкМ гистамина, который увеличивал концентрацию растворимого ФВ на  $93 \pm 22\%$ , но превосходит эффект 10 мкМ гистамина (Рис.4В).

При иммунофлуоресцентном исследовании, на поверхности ЭК, стимулированных 100 мкМ  $H_2O_2$ , обнаруживаются нити полимерного ФВ. Медианная интегральная интенсивность по краю увеличивается на 18% (Рис.5), а общая интегральная интенсивность возрастает на 24%. Значительнее всего

меняется количество ФВ-положительных структур, медианное их количество возрастает на 78% по сравнению с контрольными клетками (Рис.5). Интегральная интенсивность отдельной ФВ-положительной структуры увеличивалась на 34% под действием  $H_2O_2$ . Анализ 4 повторных экспериментов по параметрам, наиболее точно характеризующих экзоцитоз, позволил получить следующую таблицу сопряженности для 100 мкМ  $H_2O_2$  (Табл.4).



**Рис.5** Параметры яркости клеток и ФВ-положительных структур при действии 100  $H_2O_2$  и 100 мкМ гистамина. Число независимых лунок для каждой экспериментальной группы  $n=3$ , \*\*\* -  $p<0.001$ . Для анализа использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса

Таким образом, стимуляция ЭК перекисью водорода увеличивает количество событий экзоцитоза и их интегральную интенсивность, способствует формированию тромбогенных мультимерных «струн» на клеточной поверхности, медианный коэффициент Е при этом не превышает 1. Все эти данные говорят о том, что  $H_2O_2$  стимулирует тромбогенные изменения поверхности ЭК.

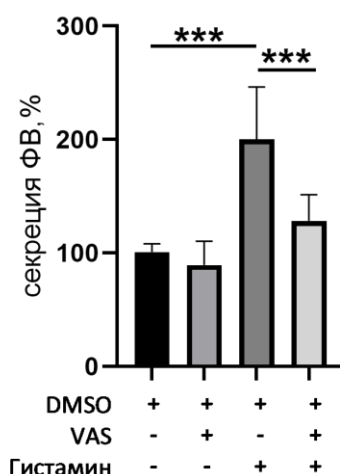
**Табл. 4**

	Уменьшается	Не меняется	Увеличивается	p value
Медианное количество структур на клетку	0	1	3	<b>0.02857</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	0	0	4	<b>0.02857</b>
Медианный коэффициент Е				<b>0,77</b>



### Ингибирование NADPH-оксидаз подавляет гистамин-индуцированную активацию экзоцитоза ФВ

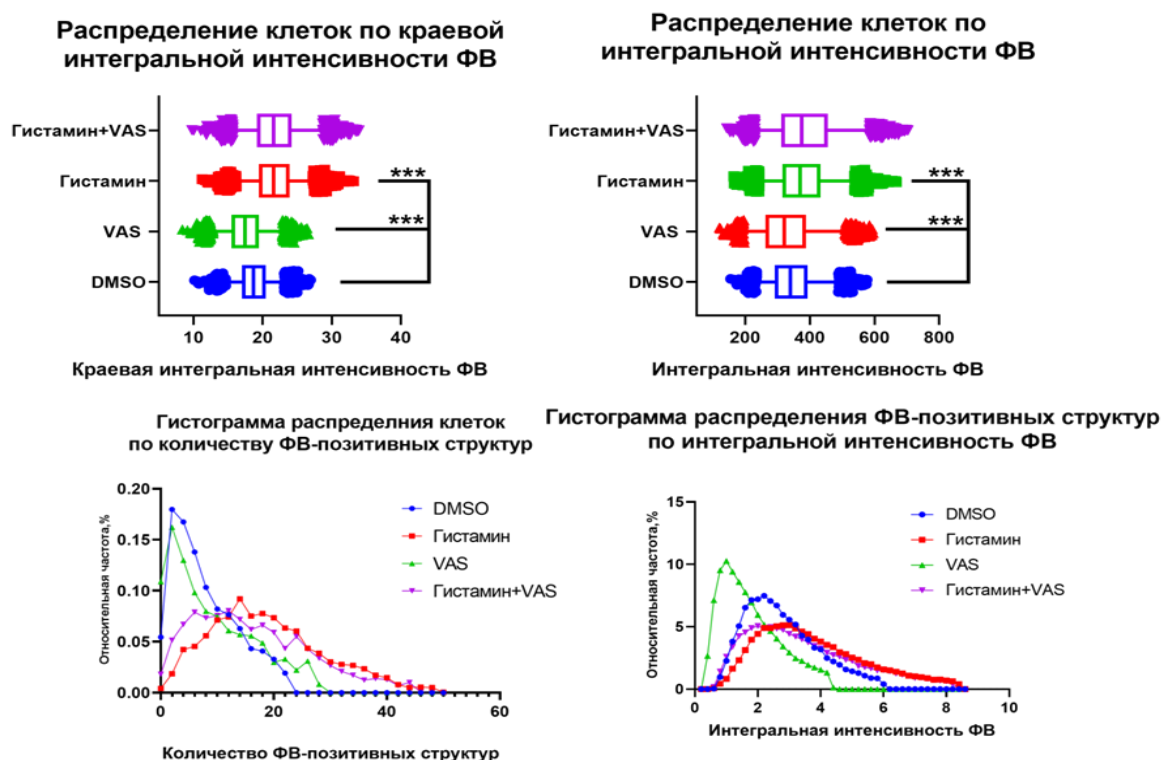
Мы использовали VAS2870, ингибитор NADPH-оксидаз, чтобы оценить их вклад в гистамин-индуцированный экзоцитоз ФВ. Методом ELISA было показано что 10 мкМ VAS2870 не влияло на количество растворимого ФВ (Рис.7) по сравнению с контрольными клетками. 100 мкМ гистамина увеличивали этот показатель в 2 раза. Пятиминутная преинкубация ЭК с 10 мкМ VAS2870, снижала прирост секретируемого ФВ в ответ на гистамин на 80% (Рис. 6).



**Рис.6** Секреция ФВ в культуральную среду ЭК при стимуляции 100 мкМ гистамина и 10 мкМ VAS2870. Данные приведены в виде mean  $\pm$  SD и представляют собой результат 3 независимых экспериментов. \*\*\* -  $p < 0.001$

Иммуногистохимическое окрашивание показало, что 10 мкМ VAS2870 влияет на базальную секрецию. Краевая интегральная интенсивность ФВ в клетках, инкубированных с VAS2870, снижалась по сравнению с контрольными клетками. 25 перцентиль падал на 10%, медиана и 75 перцентиль – на 5% по сравнению с DMSO. Интегральная интенсивность ФВ клетки также снижалась на 2-10% по всем перцентильям. Однако, количество событий экзоцитоза достоверно возрастало. Так, медиана и 75 перцентиль распределения клеток по количеству ФВ-позитивных структур увеличивались на 16 и 24% соответственно (Рис.7). Медианная интегральная интенсивность единичного события экзоцитоза под действием VAS2870 снижалась на 40%. По сравнению с контрольными клетками, инкубация со 100 мкМ гистамина повышала показатели распределения краевой интегральной интенсивности на 13-15%, а общей интегральной интенсивности клетки – на 7-10%. Статистические показатели распределения количества событий экзоцитоза на одну клетку увеличивалось в 2.8 – 3.5 раз по сравнению с контролем. Добавление VAS2870 не влияло на распределение параметров интенсивности клеток по сравнению с чистым гистамином (Рис.7). Однако, количество ФВ-позитивных структур, презентированных на ЭК значительно снижалось при действии 100 мкМ гистамина + 10 мкМ VAS2870 по сравнению с чистым гистамином. Так, 25

процентиль распределения падал на 32%, медиана и 75 процентиль – на 16% и 7% соответственно.



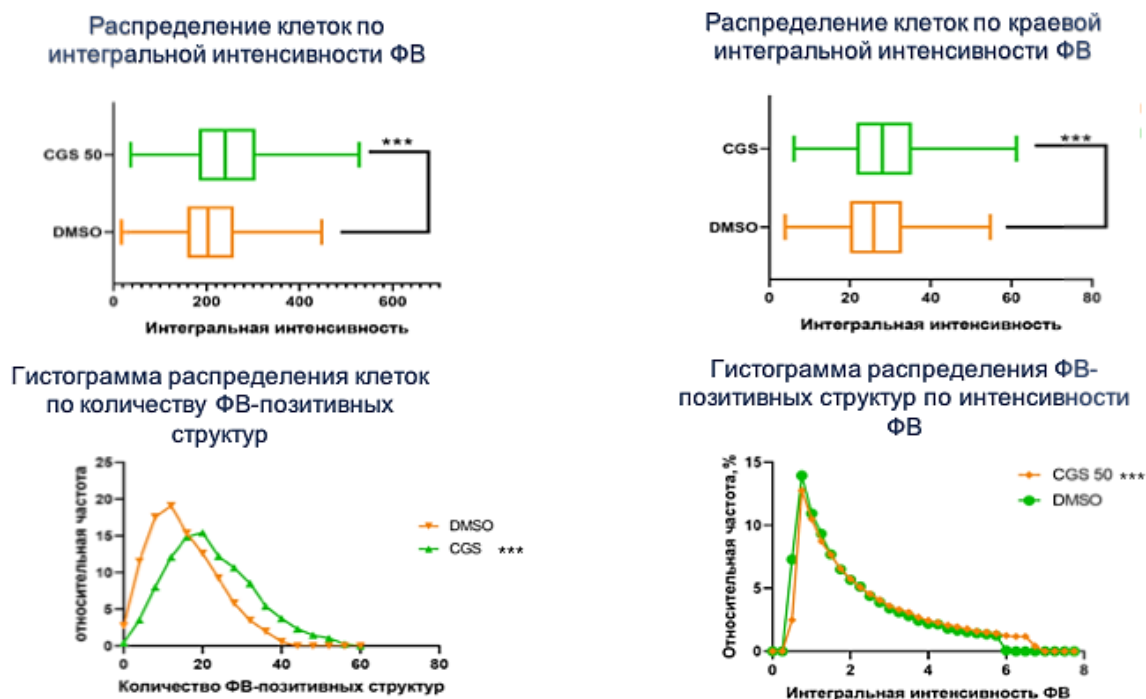
**Рис. 7** Параметры яркости клеток и ФВ-положительных структур при действии 10 мкМ VAS2870 и 100 мкМ гистамина. Число независимых лунок для каждой экспериментальной группы  $n=3$ , \*\*\* -  $p<0.001$ . Для анализа использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса

### Агонист $5HT_{1B}$ рецепторов.

Так как вклад активации  $5HT_{1B}$  рецептора серотонина, обнаруженного в ЭК, на экзоцитоз ФВ ЭК не изучен, мы воспользовались селективным агонистом данного рецептора - CGS-12066A. При инкубации клеток с 50 мкМ агонистом  $5HT_{1B}$  рецептора, CGS-12066A, медианная краевая интегральная интенсивность клеток увеличивалась на 9%. Медианная интегральная интенсивность возрастала на 19%, что сопровождалось ростом количества ФВ-положительных структур на клетках. Так, 25 процентиль распределения клеток по этому признаку возрастал на 75%, медианное значение – на 54%, а 75 процентиль — на 45% (Рис.8).

Увеличение медианной интегральной интенсивности единичной ФВ-положительной структуры составляло 17% (Рис.8). Таким образом, можно сказать, что активация  $5HT_{1B}$  рецептора стимулировала экзоцитоз ФВ из ЭК путем увеличения количества и интегральной интенсивности ФВ-положительных структур, при этом их размеры менялись слабо.. Анализ повторных экспериментов позволил сформировать следующую таблицу сопряженности (см. Табл.5)





**Рис.8** Параметры яркости клеток и ФВ-положительных структур при действии 50 мкМ CGS-12066A. Число независимых лунок для каждой экспериментальной группы n=3, \*\*\* -  $p < 0.001$ . Для анализа использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса.

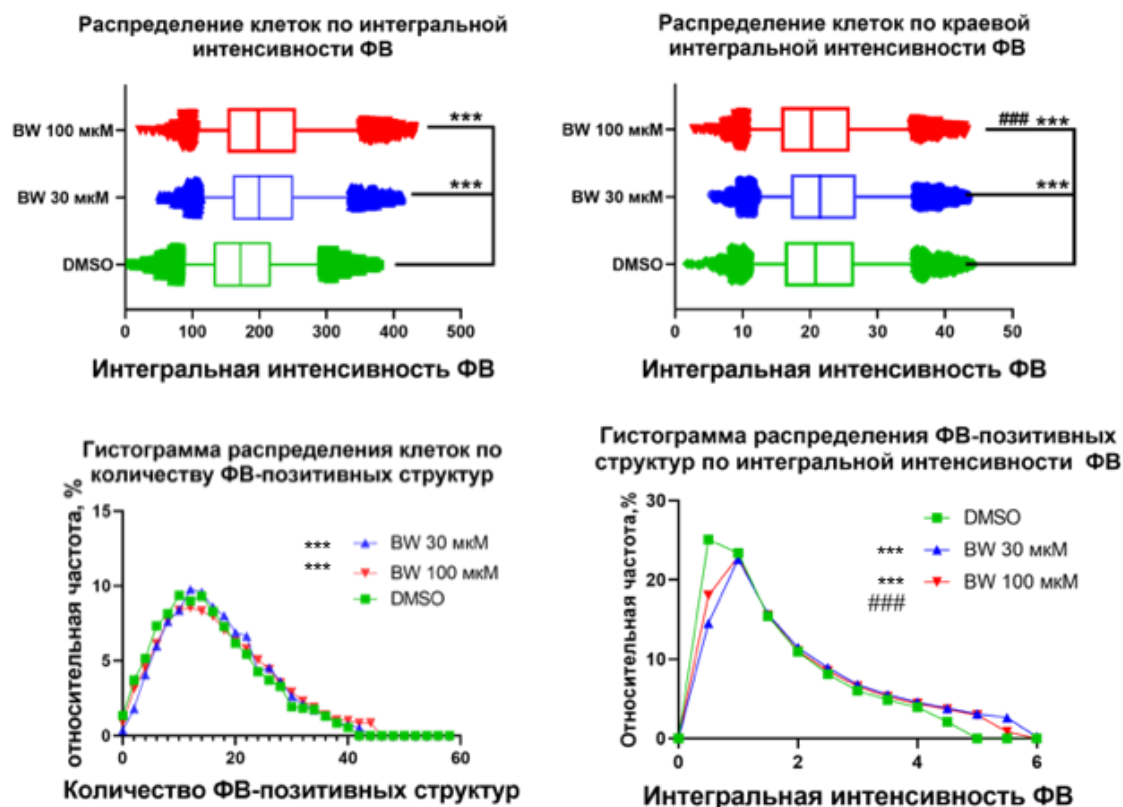
**Табл. 5**

	Уменьшается	Не меняется	Увеличивается	p value
Медианное количество структур на клетку	0	1	4	<b>0.04762</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	0	0	5	<b>0.007937</b>
Медианный коэффициент E				<b>1,62</b>

### Агонисты 5HT<sub>2B</sub> рецепторов

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало значимое изменение краевой интегральной интенсивности клеток, инкубированных с BW 30 мкМ и BW 100 мкМ, в течение 20 минут. Медианное значение признака увеличилось на 3% при инкубации с BW 30 мкМ и снижалось на 3% при действии 100 мкМ BW, более того эти 2 группы достоверно отличаются между собой. (Рис.9).

Медианная интегральная интенсивность клеток достоверно возрастала при инкубации с 30 мкМ и 100 мкМ BW (Рис.9), на 16 и 15% соответственно. Достоверной разницы между этими двумя воздействиями не выявлено (Рис.9). Количество ФВ-положительных структур на поверхности ЭК достоверно увеличивается в обеих концентрациях BW сравнению с DMSO, однако достоверной разницы между 2 концентрациями не обнаружено (Рис.9 ). Анализ сходимости результатов эксперимента позволил сформировать следующую таблицу сопряженности (Табл.6).



**Рис.9** Параметры яркости клеток и ФВ-положительных структур при действии агонистов 5HT<sub>2B</sub> рецептора. Число независимых лунок для каждой экспериментальной группы n=3, \*\*\* - p<0.001. Для анализа использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса.

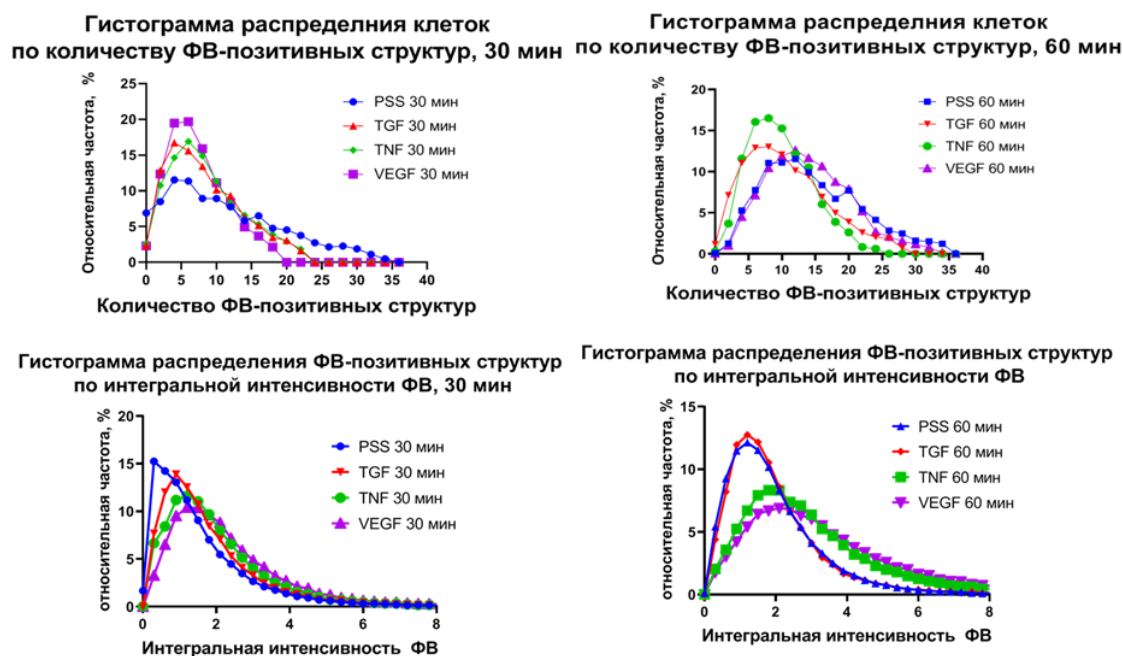
**Табл.6**

	Уменьшается	Не меняется	Увеличивается	p value
<b>BW 30 мкМ</b>				
Медианное количество структур на клетку	1	0	6	<b>0.0001</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	1	1	5	<b>0.0001</b>
Медианный коэффициент E				<b>1,23</b>
<b>BW 100 мкМ</b>				
Медианное количество структур на клетку	1	2	7	<b>0.0022</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	4	0	6	<b>0.0001</b>
Медианный коэффициент E				<b>1,31</b>
<b>Разница между BW 30 мкМ и BW 100 мкМ</b>				
	<b>30 &gt; 100</b>	<b>30 = 100</b>	<b>30 &lt; 100</b>	
Медианное количество структур на клетку	2	1	4	<b>0.0046</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	3	0	4	<b>0.0005</b>

Исходя из данных таблицы 6, можно сказать, что активация 5-HT<sub>2B</sub> рецептора ЭК с помощью BW приводила к однозначному увеличению количества и интегральной интенсивности ФВ-положительных структур на клеточной поверхности. При этом количество событий экзоцитоза увеличивалось дозозависимо, в то время как, их интегральная интенсивность нет.

### Влияние ростовых факторов - агонистов продукции АФК, на экзоцитоз ФВ

Для выявления краткосрочных и долгосрочных эффектов ростовых факторов, ЭК инкубировали в среде, содержащей физиологические концентрации данных веществ, в течение 30 и 60 минут. После 30 минутной инкубации, отмечается увеличение краевой интегральной интенсивности клеток, медианное значение признака увеличивалось на 7% в случае TGF-beta, на 12% при воздействии TNF-alpha и на 10% в случае VEGF. В то же время, интегральная интенсивность клеток падала, медианное значение уменьшалось на 12% под действием TGF-beta, на 6% под действием TNF-alpha и на 4% под действием VEGF. Количество ФВ-положительных структур на клетку достоверно снижается во всех случаях. TGF-beta снижает этот показатель на 26%, а TNF-alpha на 23% (Рис. 10). VEGF оказывал наиболее сильный эффект и снижал медианное количество ФВ-положительных структур на 34%. При 60 минутной инкубации общая интегральная интенсивность и краевая интегральная интенсивность клеток по ФВ увеличиваются в контрольной группе по сравнению с 30 минутной инкубацией. Часовая инкубация с TGF-beta снижала на 8%, а с VEGF увеличивала на 18% интегральную интенсивность клеток по ФВ по сравнению с PSS, в то время как действие TNF-alpha ослабевает, и эта группа не показала значимых отличий от контроля.



**Рис 10.** Параметры яркости ФВ-положительных структур при стимуляции ростовыми факторами. Число независимых лунок для каждой экспериментальной группы n=3, \*\*\* - p<0.001. Для анализа использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса.

При этом медианная краевая интегральная интенсивность клеток под действием TGF-beta не отличалась от PSS, TNF-alpha слегка стимулировал этот параметр, на 5%. Действие VEGF было самым сильным - краевая интегральная интенсивность при часовой инкубации возрастала на 28%. Медианное количество ФВ-позитивных структур на поверхности ЭК не отличалось в группах PSS и VEGF при часовой инкубации (Рис. 10). TGF-beta и TNF-alpha снижали данный показатель на 28% и 32% процента соответственно. Медианная интегральная интенсивность единичной ФВ-положительной структуры на поверхности клетки значительно возрастала при 30 минутной инкубации со всеми факторами роста. TGF-beta увеличивал этот параметр на 23%, TNF-alpha на 46%, а VEGF на 71% относительно контрольного значения. При часовой инкубации эффект от TGF-beta пропадал, в то время как TNF-alpha и VEGF вызывали увеличение значения данного параметра на 55% и 77% процентов соответственно (Рис.10). Анализ 4 повторных экспериментов позволил составить следующую таблицу сопряженности для факторов роста (Табл.7). TGF-beta и TNF-alpha достоверно снижали количество событий экзоцитоза и их интегральную интенсивность. VEGF не оказывал значимого влияния на количество ФВ-позитивных структур, но достоверно увеличивал их яркость по отношению к PSS.

**Табл.7**

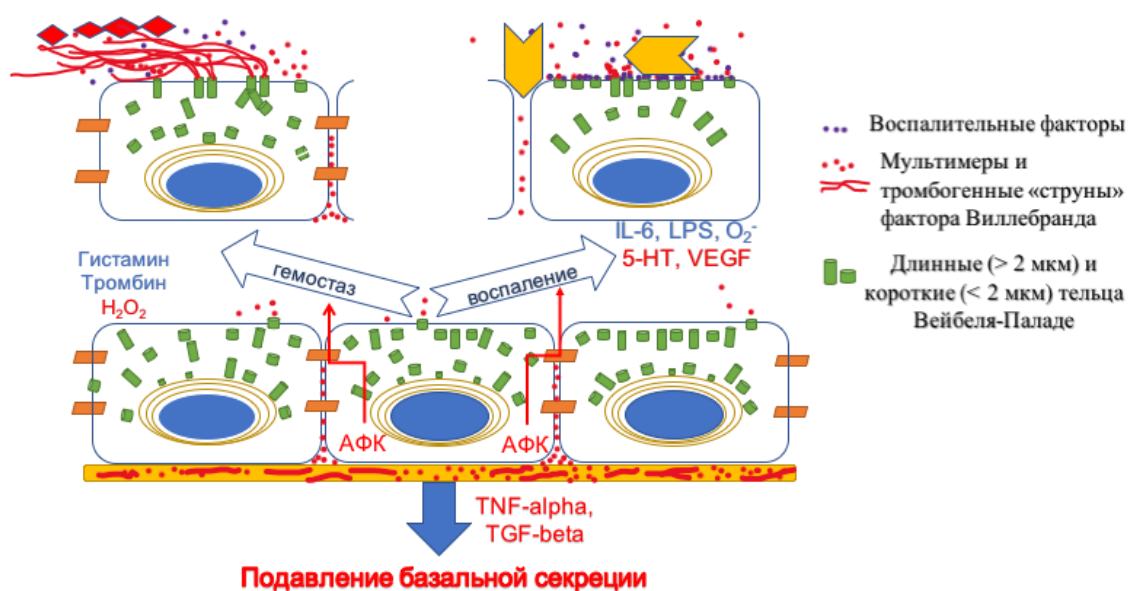
	Уменьшается	Не меняется	Увеличивается	p value
<b>TGF-beta</b>				
Медианное количество структур на клетку	4	0	0	<b>0.02857</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	2	1	1	<i>0.1429</i>
<b>TNF-alpha</b>				
Медианное количество структур на клетку	4	0	0	<b>0.02857</b>
Медианная интегральная интенсивность структуры	3	0	1	<b>0.02857</b>
<b>VEGF</b>				
Медианное количество структур на клетку	2	1	1	<i>0.1429</i>
Медианная интегральная интенсивность структуры	0	0	4	<b>0.02857</b>
Медианный коэффициент E				<b>2,23</b>

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тельца Вейбеля-Паладе являются уникальными органеллами, присущими только эндотелиальным клеткам. Основная функция этих органелл – хранение специализированных белков, коагулянта фактора Виллебранда и воспалительных факторов, и их контролируемая секреция.

Механизмы, контролирующие экзоцитоз с секрецию телец Вейбеля-Паладе, определяют пластичность клеточного ответа эндотелия на внешние стимулы и до конца не изучены. С помощью разработанного нами метода точной регистрации изменения распределения фактора Виллебранда на поверхности эндотелиальных клеток, мы охарактеризовали влияние перекиси водорода, а также некоторых сигнальных путей, стимулирующих внутриклеточную продукцию активных форм кислорода, на экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе. Обобщить полученные данные можно с помощью модифицированной схемы из раздела 7 настоящей диссертации (Рис. 11).

Согласно нашим данным, перекись водорода активирует секрецию телец Вейбеля-Паладе по гемостатическому типу. Более того, подавление активности NADPH-оксидаз ингибирует как базальную, так и гистамин-индуцированную секрецию фактора Виллебранда. Показана роль 1В и 2В рецепторов серотонина. Активация этих рецепторов стимулировала экзоцитоз фактора Виллебранда по воспалительному типу. Ростовые факторы, вовлеченные в инициацию (TNF- $\alpha$ ) и поддержание воспалительной реакции (TGF- $\beta$ ), подавляли экзоцитоз фактора Виллебранда, в то время как VEGF – основной регулятор ангиогенеза, наоборот, стимулирует наоборот, стимулировал воспалительный экзоцитоз.



**Рис. 11.** Основные результаты данной работы в свете концепции регуляции экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод регистрации экзоцитоза фактора Виллебранда на поверхность эндотелиальных клеток. Предложенный подход позволяет проводить не только качественную, но и количественную оценку клеточного ответа и учитывать его модальность.
2. Перекись водорода стимулирует экзоцитоз фактора Виллебранда, сопровождающийся формированием тромбогенных мультимеров на поверхности эндотелия.
3. Установлено, что NADPH-оксидазы участвуют в реализации действия гистамина на экзоцитоз ТВП и секрецию фактора Виллебранда.
4. Активация рецепторов серотонина 1В и 2В типов увеличивает количество событий экзоцитоза и повышает интенсивность сигнала фактора Виллебранда, что указывает на функциональную роль этих рецепторов в регуляции воспалительного ответа эндотелия.
5. TGF-beta и TNF-alpha снижают базальную секрецию фактора Виллебранда, при этом TNF-alpha оказывает более выраженное действие. VEGF, напротив, стимулирует экзоцитоз фактора Виллебранда из эндотелиальных клеток по воспалительному типу.

## Публикации по материалам диссертации:

1. Авдонин П.В., Цитрина А.А., Миронова Г.Ю., Авдонин П.П., Жарких И.Л., Надеев А.Д., Гончаров Н.В. Пероксид водорода стимулирует экзоцитоз фактора Виллебранда эндотелиальными клетками пупочной вены человека. Известия академии наук. Серия биологическая. 2017. № 5. С. 549-556.
2. Авдонин П.В., Надеев А.Д., Цитрин Е.Б., Цитрина А.А., Авдонин П.П., Миронова Г.Ю., Жарких И.Л., Гончаров Н.В. Участие двупоровых каналов в вызываемом пероксидом водорода подъеме уровня ионов кальция в цитоплазме эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Доклады Академии Наук. 2017. Т. 474. № 4. С. 501-504.
3. Avdonin P.V., Rybakova E.Yu., Avdonin P.P., Trufanov S.K., Mironova G.Yu., Tsitrina A.A., Goncharov N.V. VAS2870 Inhibits Histamine-Induced Calcium Signaling and vWF Secretion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells // Cells. 2019. V. 8 P. 196. DOI:10.3390/cells8020196.
4. Trufanov S.K., Rybakova E.Yu., Avdonin P.P., Tsitrina A.A., Zharkikh I.L., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Avdonin P.V. The Role of Two-Pore Channels in Norepinephrine-Induced  $[Ca^{2+}]_i$  Rise in Rat Aortic Smooth Muscle Cells and Aorta Contraction // Cells. 2019. V. 8. P. 1144. DOI: 10.3390/cells8101144.

## Список сокращений

**5-НТ** – 5-гидрокситриптамиин (серотонин)

**АФК** – активные формы кислорода

**ТВП** – тельца Вейбеля-Палладе

**ФВ** – фактор Виллебранда

**ЭК** – эндотелиальные клетки

**Ca<sup>2+</sup>** - ион кальция

**cAMP** – циклический аденозинмонофосфат

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – перекись водорода

**TGF-beta** – трансформирующий фактор роста бета

**TNF-alpha** – фактор некроза опухоли альфа

**VEGF** – фактор роста эндотелия сосудов