

Т.И. Игнашкова, М.В. Меситов, А.С. Рыбаков, А.А. Московцев, А.А. Соколовская, А.А. Кубатиев

Депонирование фактора Виллебранда в эндотелиальных клетках человека HUVEC в условиях стресса эндоплазматического ретикулума, индуцированного избытком гомоцистеина, *in vitro*

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*Фактор Виллебранда (ФВ) — гликопротеин, синтезируемый эндотелиальными клетками и мегакариоцитами. При характерной для гипергомоцистеинемии дисфункции эндотелия имеют место нарушения секреции ФВ эндотелиальными клетками. Проведенные нами исследования показали изменения внутриклеточного содержания фактора Виллебранда в культивируемых эндотелиальных клетках человека при действии избытка гомоцистеина *in vitro*. Первичную культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) инкубировали с различными концентрациями D,L-гомоцистеина (0,025—5 мМ/л). Гомоцистеин в концентрации 0,025 и 0,25 мМ/л после 18 часовой инкубации вызывал увеличение содержания фактора в клетках HUVEC. Высокие концентрации гомоцистеина индуцировали дозо-зависимое снижение внутриклеточного уровня ФВ. Выявленные нами вариации дозо-зависимых ответов на гомоцистеин могут указывать на различные механизмы модуляции гомоцистеином комплекса процессов депонирования, конститутивной секреции и деградации ФВ в эндотелиоцитах человека. Стресс эндоплазматического ретикулума, идентифицированный нами в клетках HUVEC при действии избытка гомоцистеина, может сопровождаться ростом внутриклеточного уровня ФВ при сравнительно невысокой интенсивности воздействия. При той же продолжительности действия, но более высокой концентрации индуктора, регистрируется снижение уровня ФВ, которое может быть обусловлено ЭПР-стресс-ассоциированной деградацией.*

Ключевые слова: фактор фон Виллебранда, гомоцистеин, HUVEC, эндотелий

T.I. Ignashkova, M.V. Mesitov, A.S. Rybakov, A.A. Moskovtsev, A.A. Sokolovskaya, A.A. Kubatiev

Deposition of von Willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine *in vitro*

The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

*Von Willebrand factor (vWF) is an adhesive glycoprotein synthesized and secreted by endothelial cells and megakaryocytes. Violation of vWF secretion by endothelial cells is a characteristic feature of endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemia. In our study we examined to clarify the concentration-dependent effect of homocysteine (Hcy) on the expression of vWF. Our studies have shown that homocysteine excess induces changes in the intracellular deposition of von Willebrand factor in cultured human endothelial cells *in vitro*. Primary cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were incubated with the various concentrations of D,L-homocysteine (0.025 — 5 mM/L). Homocysteine at a concentration of 0.025 and 0.25 mM / L after 18 h incubation caused an increase in the intracellular fraction of vWF in HUVEC cells. High concentrations of homocysteine induced a dose-dependent decrease in the intracellular fraction of vWF. These dose-dependent variations may indicate the modulation by homocysteine of different mechanisms of the deposition, the constitutive secretion and the degradation of vWF in human endothelial cells. We proposed that Endoplasmic reticulum stress, in HUVEC cells by the action of an excess of homocysteine associated with increased intracellular levels of vWF at a relatively low concentration of the inducer. We found decline in intracellular vWF at the same duration but higher concentrations of inducer, which may be due to the ER-associated protein degradation.*

Key words: Von Willebrand factor, homocysteine, HUVEC, endothelial cells

Сосудистый эндотелий продуцирует ряд физиологически важных соединений, к которым относится фактор Виллебранда (ФВ) [2] — сложный мульти-

мерный гликопротеин, ген которого расположен на хромосоме 12 (12p13.2) и включает в себя 52 экзона. Одной из важных функций ФВ является стабилизация и транспорт фактора VIII в составе комплекса [13].

Эндотелий, в зависимости от принадлежности к органу, а также звену сосудистого русла, различается

Для корреспонденции: Игнашкова Татьяна Игоревна, аспирант лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: tjanochka@gmail.com

по уровню продукции ФВ. В частности, в эндотелиоцитах сосудов легких, сердца, скелетных мышц выявлен сравнительно высокий уровень м-РНК ФВ, а в почках и печени — относительно низкий. ФВ также синтезируется мегакариоцитами.

Фактор Виллебранда депонируется в эндотелиальных клетках в специализированных секреторно-запасующих гранулах — так называемых тельцах Вейбеля—Палада (тВП) [2] с характерной палочкообразной формой, нетипичной для большинства внутриклеточных включений.

Известны два механизма секреции продуцируемого эндотелиальными клетками ФВ: конститутивный, направленный как в апикальную, так и базолатеральную стороны эндотелиального слоя; и индуцибельный, включающий в себя процессы упаковки и хранения фактора в тВП с последующим экзоцитозом в ответ на действие физиологических агонистов или травмы.

Индукцибельный путь ориентирован на рекрутирование тромбоцитов. Наиболее задействованы в процессах гемостаза высокомолекулярные полимеры фактора. Большая часть образующихся в эндотелии мультимеров ФВ депонируется в тВП. В ответ на действие агонистов, индуцирующих рост уровней вторичных посредников (Ca^{2+} или цАМФ), происходит экзоцитоз тВП в базолатеральном направлении, что приводит к увеличению содержания крупных мультимеров ФВ во внеклеточном матриксе [14]. Такая уникальная полярность и однонаправленность экзоцитоза может нарушаться при физическом повреждении эндотелия — мультимеры ФВ секретируются и в плазму, и во внеклеточный матрикс (подэндотелиальный слой).

Рост концентрации ФВ в крови может указывать на возможные повреждения эндотелия и наличие сосудистых заболеваний [3, 9], уровень ФВ предложен в качестве показателя эндотелиальной дисфункции [8]. Многие патологии, такие, как сахарный диабет, атеросклероз, онкологические заболевания, сопровождаются острыми и хроническими повреждениями эндотелия, приводящими к повышению уровня ФВ в крови [1, 5]. Однако увеличение ФВ может наблюдаться и в физиологических условиях, в частности, после физической нагрузки. При гипотиреозидизме и системной красной волчанке концентрация ФВ, наоборот, снижена.

Патологическое состояние гипергомоцистеинемии, характеризующееся повышением уровня гомоцистеина в плазме крови, также ассоциировано с эндотелиальной дисфункцией. Было отмечено, что гомоцистеин ингибирует выработку и высвобождение ФВ из эндоплазматического ретикула эндотелиальных клеток [6]. Вместе с тем, данные литературы о внутрикле-

точном содержании ФВ в эндотелиальных клетках при действии избытка гомоцистеина противоречивы. Ряд данных указывает на возможность существования дополнительных механизмов, влияющих на внутриклеточное депонирование и секрецию ФВ эндотелиоцитами при гипергомоцистеинемии.

Цель исследования — изучение процесса внутриклеточного депонирования ФВ и анализ общего его содержания в культивируемых эндотелиоцитах человека *in vitro*.

Методика

Культура клеток

Первичную культуру эндотелиальных клеток вены пуповины человека (HUVES — human umbilical vein endothelial cells) изолировали из препаратов пупочной вены человека обработкой коллагеназой. Эндотелиоциты HUVES культивировали в среде 199 с солями Эрла (Gibco, США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), фактора роста эндотелиальных клеток (Gibco, США) и антибиотика (Gentamicin, Gibco, США) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . В экспериментах использовали клетки 2—4 пассажей.

Полученную первичную культуру иммунофенотипировали с целью оценки экспрессии клетками маркеров, характерных для эндотелиоцитов. Для измерения экспрессии поверхностных клеточных маркеров методом проточной цитометрии клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и инкубировали с моноклональными антителами анти-CD34-FITC, анти-CD31-FITC, анти-CD105-FITC (BD Biosciences, США) 1 час, повторно отмывали для минимизации неспецифического мечения, ресуспендировали в ФСБ, содержащем 1%-ный раствор параформальдегида.

Для исследования влияния гомоцистеина на внутриклеточный пул ФВ клетки HUVES в концентрации 5×10^5 в 1 мл культивировали в присутствии различных концентраций D,L-гомоцистеина (Sigma, St Louis, США) (0,025—5 мМ/л) в течение 18 ч. Для детектирования ФВ была использована непрямая реакция иммунофлюоресценции с последующим анализом при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа (ЛКСМ) и метода проточной цитофлюориметрии (ПЦФМ). ЛКСМ в данной работе использовалась нами для исследования внутриклеточных дискретных включений ФВ, в частности, их количества, размера, морфологии, ПЦФМ — для анализа распределения клеток по величине внутриклеточного уровня ФВ.

Иммуноцитохимия

Клетки HUVEC рассеивали в 6-луночный планшет на покровные стекла, обработанные 0,1% коллагеном. После инкубации в присутствии различных концентраций Нсу (0,025—5,0 мМ/л), клетки фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабилizировали 0,01% Тритон X-100 и блокировали 3% БСА (бычьим сывороточным альбумином). После чего клетки окрашивали первичными поликлональными антителами к ФВ (anti-Von Willebrand Factor, Abscam, Великобритания) и вторичными родамин-мечеными антителами (KPL, США). Визуализация субклеточной локализации ФВ проводилась при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа ECLIPSE TE2000U (Nikon, Япония) с использованием программного обеспечения EZ версии 2.3.

Для измерения внутриклеточной экспрессии ФВ клетки HUVEC фиксировали в 0,01% формальдегиде в течение 15 мин. Пермеабилizацию клеточной мембраны осуществляли ФСБ, содержащим 0,1% сапонин в течение 10 мин. После чего клетки отмывали и инкубировали с первичными поликлональными антителами к ФВ (Abscam, Англия) 1 час, затем инкубировали с ФИТЦ-мечеными вторичными антителами (KPL, США).

Перед измерением методом проточной цитометрии клетки HUVEC диссоциировали при помощи трипсина (0,25%) с ЭДТА при 37°C в течение 5 мин.

Сбор и анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, США) с аргоновым лазером (длина волны 488 нм) с использованием программного обеспечения CELLQuest. В каждом образце анализировали не менее 10000 событий. Эмиссию флуоресценции (FITC) регистрировали в канале FL1 (515—545 нм). Изотип-специфические FITC-меченные антитела были использованы как контроль.

Обработка изображений

Для оценки морфологических изменений телец Вейбеля—Палада полученные методом ЛКСМ изображения подвергались бинаризации с последующей процедурой анализа частиц с помощью программного обеспечения ImageJ 1.45s (NIH, США). Затем рассчитывались отношения больших и малых осей эллипсов, использованных в качестве фигур аппроксимации. Эти отношения, полученные для каждого изображения, подвергались статистическому анализу.

Статистическая обработка данных, собранных методом проточной цитометрии, проводилась с помощью критерия Колмогорова—Смирнова, а остальных результатов — с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное иммуноцитохимическое исследование (рис. 1) показало, что инкубация клеток с избытком гомоцистеина модулирует морфологию телец ВП, содержащих ФВ. Морфометрически (рис. 2) было обнаружено уменьшение отношения продольных размеров гранул к поперечным для концентраций гомоцистеина 0,25 мМ/л ($p=0,0136$) и 2,5 мМ/л ($p=0,0096$).

В препаратах визуализированных с помощью ЛКСМ клеток HUVEC, инкубированных с 5 мМ/л гомоцистеина 18 ч, наблюдалась тенденция к снижению суммарной интенсивности флуоресценции ФВ по сравнению с контролем. Результаты исследований, полученные методом проточной цитометрии, показали, что малые и средние концентрации гомоцистеина 0,025 и 0,25 мМ/л вызывали увеличение уровня внутриклеточного ФВ.

При концентрации 0,025 и 0,25 ммоль/л процент клеток, превышающих установленное значение интенсивности флуоресценции, ассоциированной с ФВ, увеличивался до 24 и 44% соответственно, тогда как контрольный уровень ФВ составлял в среднем 16% (рис. 3). При высоких концентрациях гомоцистеина процент таких клеток снижался до 15 и 6% для концен-

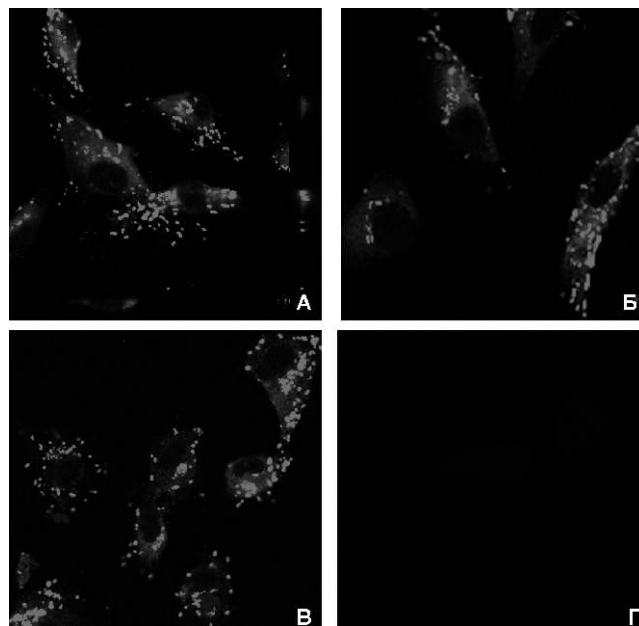


Рис. 1. Внутриклеточное депонирование ФВ в эндотелиальных клетках человека HUVEC. Клетки HUVEC инкубировали в 6-луночном планшете на покровных стеклах в присутствии гомоцистеина 18 ч. После инкубации клетки фиксировали, пермеабилizовали и инкубировали с поликлональными антителами к фактору вон Виллебранда: А — контрольные клетки без добавления гомоцистеина; Б—В — клетки в присутствии гомоцистеина: Б — Нсу 0,25 мМ/л; В — Нсу 2,5 мМ/л; Г — изотипический контроль — клетки, инкубированные только мечеными родамином антителами

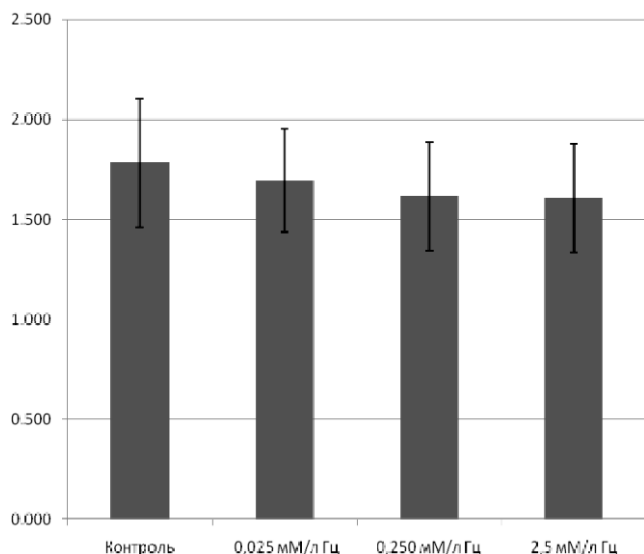


Рис. 2. Отношение продольных к поперечным размерам гранул, меченных антителами к ФВ в клетках HUVEC, инкубированных с избытком гомоцистеина. Изображения, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, подвергали процедуре бинаризации с последующим анализом частиц с помощью программного обеспечения ImageJ 1.45s (NIH, США), после чего рассчитывали отношения больших и малых осей аппроксимирующих эллипсов

траций 2,5 и 5 ммоль/л соответственно. На рис. 3Б представлены примеры гистограмм, иллюстрирующих распределение клеток, инкубированных в присутствии гомоцистеина, по интенсивности флуоресценции. Интересно, что для концентрации гомоцистеина 0,25 мМ/л наблюдается уширение пика — характер распределения клеток напоминает скорее бимодальный. Это наблюдение, по-видимому, может указывать на гетерогенность эндотелиоцитов по внутриклеточному уровню ФВ — т.е. наличие субпопуляции с относительно высоким содержанием ФВ и клеток с уровнем ФВ, близким к контрольным значениям.

Для анализа возможных изменений в секреторном пути эндотелиоцитов при действии избытка гомоцистеина нами было проведено исследование экспрессии ЭПР-резидентных белков в эндотелиоцитах HUVEC методом иммуноцитохимии с применением моноклональных антител, специфичных к сигналу KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) локализации в ЭПР. Наиболее представленными белками ЭПР с такими сигналами являются шапероны HSPA5 (GRP78, или BiP), HSP90B1 (GRP94), белки семейства протеиндисульфизомераз (PDI). Повышение экспрессии этих белков ассоциировано со стрессом эндоплазматического ретикулума и индукцией адаптивного каскада — ответа на белки с ненативными конформациями — UPR (Unfolded Protein Response). Проведенное нами исследование методом ЛКСМ с 3D-реконструкцией (рис. 4, 5) показало, что гомоцистеин в концентрации 0,25 мМ/л

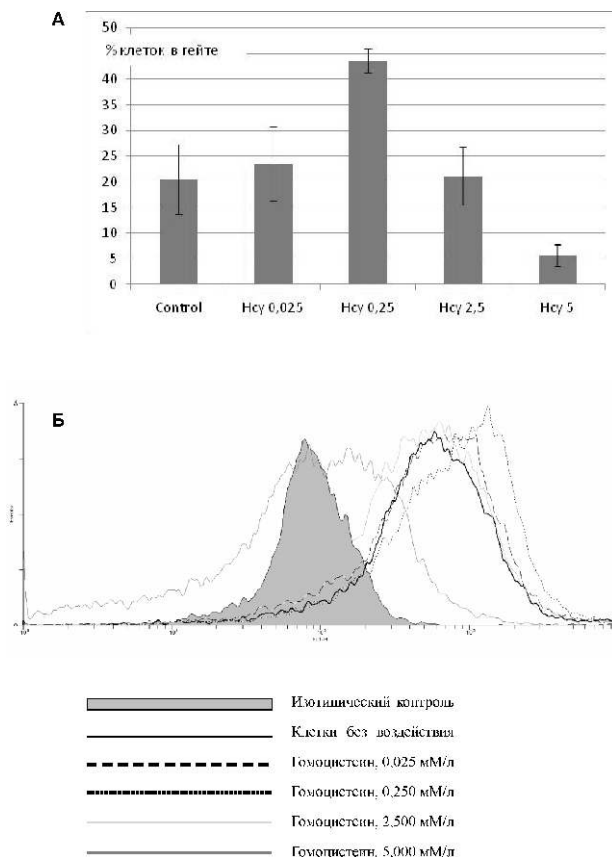


Рис. 3. Изменение внутриклеточного уровня ФВ под влиянием различных концентраций гомоцистеина. Культуру клеток HUVEC инкубировали в присутствии гомоцистеина в диапазоне концентраций 0,025–5 мМ/л в течение 18 ч. После чего клетки снимали с подложки при помощи трипсина с ЭДТА и фиксировали в 0,01% формальдегиде, пермеабелизовали 0,1% сапонином. Затем клетки отмывали и инкубировали с первичными поликлональными антителами к ФВ (Abscam, UK) 1 ч и ФИТЦ-мечеными вторичными антителами (KPL, USA) 30 мин. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur: А — процент клеток в гейте; Б — однопараметрические гистограммы

вызывает увеличение экспрессии шаперонов ЭПР, при концентрации 5 мМ/л наблюдались признаки перераспределения шаперонов в везикулы. Полученные данные позволяют предположить, что избыток гомоцистеина индуцирует ЭПР-стресс. В клетках, инкубированных с высокими концентрациями гомоцистеина, визуализируются гранулы с высокой концентрацией шаперонов — основываясь на полученных данных и данных литературы, можно предположить, что в клетках развиваются процессы протеасомной деградации (ERAD).

В ряде работ [6, 10] было показано, что гомоцистеин в концентрации 3–5 мМ/л вызывает значительное увеличение внутриклеточного содержания ФВ. Результаты экспериментов, проведенных нами с использованием проточной цитометрии и ЛКСМ, показали, что гомоцистеин в концентрации 0,025 и

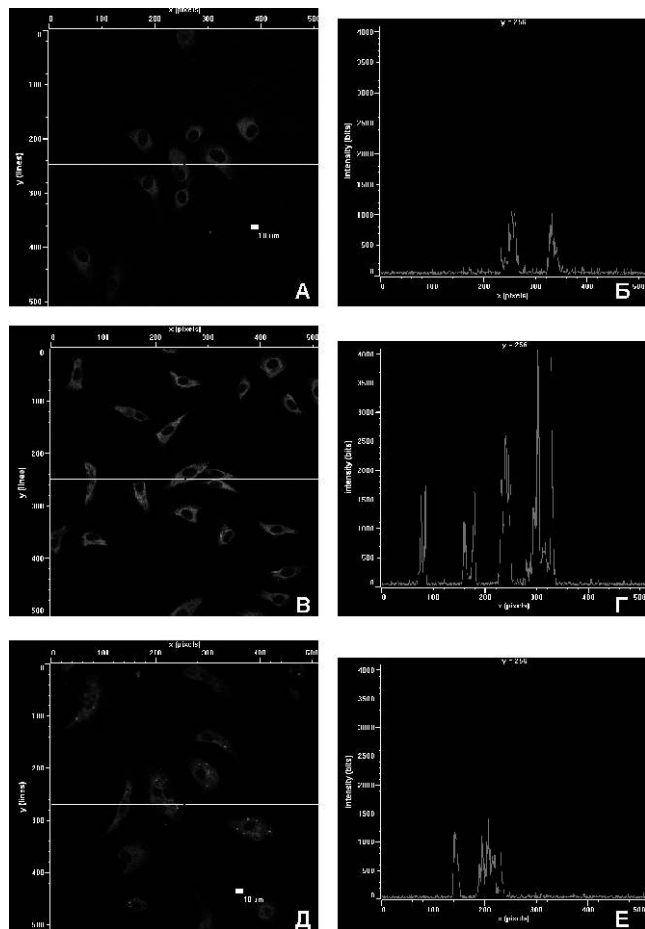


Рис. 4. Экспрессия ЭПР-резидентных белков с сигналом локализации KDEL в эндотелиоцитах HUVEC, инкубированных с избытком гомоцистеина, ЛКСМ: микрофотографии (А, В, Д) и соответствующие гистограммы (Б, Г, Е): А, Б — контроль, 18 ч без воздействия; В, Г — гомоцистеин 0,25 мМ/л, 18 ч; Д, Е — гомоцистеин 2,5 мМ/л, 18 ч

0,25 мМ способствует росту уровня внутриклеточного ФВ, инкубация с ГЦ в концентрации 2,5 и 5 мМ/л уменьшает содержание внутриклеточного ФВ. При инкубации с избытком гомоцистеина изменяется форма и количество телец Вейбеля—Палада.

Проведенные нами иммуноцитохимические исследования показали, что избыток гомоцистеина индуцирует стресс ЭПР в эндотелиоцитах HUVEC, что согласуется с работами других исследователей. Снижение внутриклеточного уровня ФВ в HUVEC происходит на фоне существенного увеличения экспрессии шаперонов ЭПР — маркеров ЭПР стресса. По-видимому, падение уровня ФВ может быть ассоциировано с повышением протеасомной деградации в условиях нарушенного процесса конформационного созревания белков в ЭПР.

Продуктом трансляции 8,7 кб мРНК ФВ является полипептид ргегро-*v*WF, состоящий из 2813 аминокис-

лотных остатков, из которых 22 представляют собой сигнальный пептид, 741 а.о. — так называемый пропептид, оставшиеся 2050 а.о. соответствуют зрелой субъединице с массой около 278 кДа [14]. Субъединицы рго-*v*WF димеризуются в эндоплазматическом ретикулуме через образование дисульфидных связей между С-концами. Гликозилированные в ЭПР рго-*v*WF димеры затем поступают в комплекс Гольджи, где при характерном рН (6,2 в отличие от рН в ЭПР 7,4) формируются «димерные букеты» и затем уже межсубъединичные дисульфидные связи между N-концевыми участками димеров («голова-к-голове») (16). То есть, таким образом, происходит мультимеризация димеров — инициализируется сборка N-концевых доменов в спиральную трубку тельца Вейбеля—Палада (16). Для описанного процесса сшивки N-концов необходимо наличие пропептида, домены которого D1 и D2 включают в себя мотивы (последовательности) СХХС, характерные для оксидоредуктаз, участвующих в образовании и/или изомеризации дисульфидных связей. Считается, что пропептид обладает оксидоредуктазной активностью, результатом которой становятся мультимерные комплексы *v*WF, состоящие из более 40 субъединиц с общей массой свыше 20 000 кДа и сопоставимые по размерам с тромбоцитами (около 4 мкм) [14].

Таким образом, при синтезе мультимерных комплексов ФВ и последующем их депонировании в тВП имеют место два пространственно разделенных процесса образования дисульфидных связей — при образовании димеров в ЭПР и мультимеров в комплексе Гольджи. Наблюдавшееся нами уменьшение продольных размеров тВП может указывать, по-видимому, на нарушение процесса полимеризации ФВ в присутствии избытка гомоцистеина. Гомоцистеин, как показали мы и ряд других авторов, в эндотелиальных клетках индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума — по-видимому, этот процесс обусловлен нарушением образования дисульфидных связей в люмене ЭПР. Наши наблюдения указывают на возможность того, что избыток

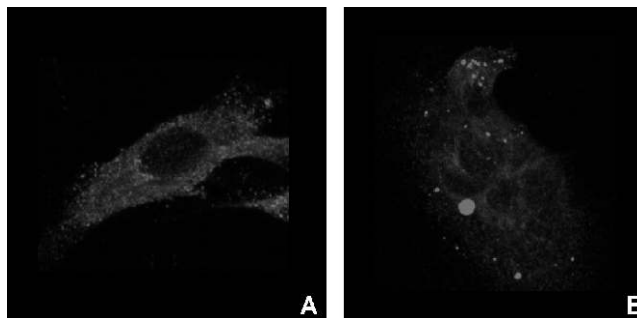


Рис. 5. Экспрессия ЭПР-резидентных белков с сигналом локализации KDEL в эндотелиоцитах HUVEC, инкубированных с избытком гомоцистеина, ЛКСМ, 3D-реконструкция: А — гомоцистеин 0,25 мМ/л, 18 ч; Б — гомоцистеин 5 мМ/л, 18 ч

ГЦ может влиять и на процесс образования дисульфидных связей при мультимеризации, причем это может иметь место при концентрациях ГЦ, существенно меньших тех, которые ассоциированы с пиковым ЭПР-стрессовым ответом. Обращает на себя внимание обнаруженное нами увеличение содержания в клетках ФВ при инкубации с гомоцистеином в диапазоне концентраций до 0,25 мМ/л. Можно предложить несколько возможных объяснений этому — увеличение продукции ФВ, снижение базального экзоцитоза. Для стресса ЭПР характерен блок трансляции, снижение скорости поступления полипептидных цепей в люмену ЭПР и синтеза белка ЭПР-ассоциированными рибосомами. Это, по-видимому, не соответствует предположению о возможном увеличении продукции ФВ. Предполагаемая модуляция гомоцистеином экзоцитоза в эндотелиоцитах вызывает определенный интерес в связи с недавним исследованием (15), предполагающим наличие редокс-активных пар цистеина в нейрональном белке SNARE-25 — гомологе распространенного в клетках белка SNARE-23, участвующего в процессе «причаливания» везикул, в том числе экзоцитозных, к мембранам клетки. Для уточнения механизмов, лежащих в основе данного явления, требуется проведение дополнительных исследований.

Список литературы

1. **Spiel A.O., Gilbert J.C., Jilma B.** von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes // *Circulation*. — 2008. — 117. — P. 1449–1459.
2. **Giblin J.P., Hewlett L.J., Hannah M.J.** Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells // *Blood*. — 2008. — 112. — P. 957–964.
3. **Lip G.Y., Blann A.** von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? // *Cardiovascular Research*. — 1997. — 34. — P. 255–265.
4. **Griendling K.K., Alexander R.W.** Oxidative stress and cardiovascular disease // *Circulation*. — 1997. — 96. — P. 3264–3265.

5. **Jakubowski H.** Pathophysiological Consequences of Homocysteine Excess // *J. Nutrition*. — 2006. — 136. — P. 1741S–1749S.

6. **Lentz S.R., Sadler J.E.** Homocysteine Inhibits von Willebrand Factor Processing and Secretion by Preventing Transport From the Endoplasmic Reticulum // *Blood*. — 1993. — Vol. 81. — P. 683–689.

7. **Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T.** Bosman Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. — 2006. — Vol. 54(4). — P. 385–395.

8. **Outinen P.A., Sood S.K., Pfeifer S.I., Pamidi S., Podor T.J., Li J., Weitz J.I., Austin R.C.** Homocysteine-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Growth Arrest Leads to Specific Changes in Gene Expression in Human Vascular Endothelial Cells // *Blood*. — 1999. — Vol. 94 (3). — P. 959–967.

9. **Mannucci P.M.** von Willebrand Factor: A Marker of Endothelial Damage? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1998. — 18. — P. 1359–1362.

10. **Roybal C.N., Yang S., Sun C.W., Hurtado D., Vander Jagt D.L., Townes T.M., Abcouwer S.F.** Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4 // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Apr. 9. — 279(15). — P. 14844–14852.

11. **Tawakol A., Forgiione M.A., Stuehlinger M., Alpert N.M., Cooke J.P., Loscalzo J., Fischman A.J., Creager M.A., Gewirtz H.** Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium — dependent vasodilation function in humans // *Circulation*. — 1997. — 95. — P. 1119–1121.

12. **Vane J.R., Anggard E.E., Batting R.M.** Regulatory functions of the vascular endothelium // *New England Journal of Medicine*. — 1990. — 323. — P. 27–36.

13. **Vanhoutte P.M., Mombouli J.V.** Vascular endothelium: vasoactive mediators // *Prog. Cardiovasc. Dis.* — 1996. — 39. — P. 229–238.

14. **Aird W.C.** (ed.) *Endothelial Biomedicine*. — Cambridge University Press, 2007.

15. **Bock L.V., Hutchings B., Grubmuller H., Woodbury D.J.** Chemomechanical Regulation of SNARE Proteins Studied with Molecular Dynamics Simulations // *Biophysical Journal*. — 2010. — 90. — P. 1221–1230.

16. **Springer T.A.** Biology and physics of von Willebrand factor concatamers // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2011. — 9 (Suppl. 1). — P. 130–143.

Поступила 23.04.12

Сведения об авторах:

Игнашкова Татьяна Игоревна, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

Меситов Михаил Валентинович, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

Рыбаков Антон Станиславович, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ НИИОПП РАМН

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной геномики и липидомики ФГБУ НИИОПП РАМН

Кубатиев Аслан Амирханович, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, директор ФГБУ НИИОПП РАМН