

УДК 57.085.23

^{1,2}А.К. Цой*, ¹Ш.Н. Аскарова, ²Т.М. Шалахметова, ¹Б.А. Умбаев¹Центр Наук о Жизни, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана²Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: andrey@tsoys.com

Влияние активных форм кислорода на мобилизацию Р-селектина и полимеризацию актина в нейроваскулярных эндотелиоцитах при воздействии Аβ42

В настоящем исследовании было изучено влияние олигомеров Аβ42 на мобилизацию Р-селектина и полимеризацию актина в нейроваскулярных эндотелиоцитах (bEnd3 клетки). Результаты проведенных исследований показали, что Аβ42 индуцирует аккумуляцию Р-селектина на плазматической мембране и полимеризацию актина в bEnd3 клетках, причем, данные процессы находятся в тесной корреляции с возрастающим уровнем активных форм кислорода (АФК). Быстрый сигнальный ответ, опосредованный АФК, может представлять собой важный физиологический механизм в развитии микрососудистого воспаления при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: β-амилоид, Р-селектин, АФК, эндотелиальные клетки церебральных капилляров, актин

А.К. Цой, Ш.Н. Аскарова, Т.М. Шалахметова, Б.А. Умбаев

Аβ42 әсері жағдайында оттегінің белсенді түрлерінің нейроваскулярлы эндотелиоциттердегі Р-селектиннің мобилизациясына және актиннің полимеризациясына ықпалы

Р-селектин және актиндік микрофиламенттер қабыну процесстерінде маңызды рольді атқарады. Сонымен бірге, Альцгеймер ауруының дамуында тамырлар патологиясының жоғары маңызы туралы мәліметтердің саны турақты өсуде. Осы зерттеуде Аβ42 олигомерлерінің нейроваскулярлы эндотелиоциттердегі (bEnd3 жасушалары) Р-селектиннің мобилизациясына және актиннің полимеризациясына әсері зерттелді. Жүргізілген зерттеулердің нәтижелері Аβ42 әсерінен bEnd3 жасушалардағы Р-селектиннің плазмалық мембранада жинақталатынының және актиннің полимеризациясын көрсетті, және де осы процесстердің оттегінің белсенді түрлерінің деңгейінің өсуімен тығыз байланыста болғаны анықталды. Оттегінің белсенді түрлерімен реттелетін, осындай шапшаң сигналды жауапты Альцгеймер ауруы кезінде микротамырлық қабынудың дамуында маңызды физиологиялық механизм ретінде қарастыруға болады.

Түйін сөздер: бета-амилоид, Р-селектин, оттегінің белсенді түрлері, ми қылтамырларының эндотелиальды жасушалары, актин

A.K. Tsoi, Sh.N. Askarova, T.M. Shalahmetova, B.A. Umbaev

Role of ros in AB42 mediated cell surface P-selectin expression and actin polymerization

P-selectin and actin cytoskeleton reorganization play an important role in vascular inflammation. In turn, there is increasing evidence that cerebrovascular factors contribute significantly to the development and progression of Alzheimer's disease. In this study we have evaluated the effects of Aβ42 oligomers on P-selectin expression and actin polymerization in mouse endothelial cells (bEnd3). Our results indicated that Aβ42 induced plasma membrane accumulation of P-selectin and promoted actin polymerization, and these events were correlated with increased reactive oxygen species (ROS) generation. The rapid, posttranslational cell signaling response mediated by ROS may well represent an important physiological trigger of the microvascular inflammation in Alzheimer disease.

Key words: β-amyloid, P-selectin, ROS, cerebral endothelial cells, actin

Болезнь Альцгеймера (БА) это нейродегенеративное заболевание, которому подвержено приблизительно 10% популяции людей в возрасте от 65 лет и 40% среди лиц в возрасте от

80 лет. Точные механизмы развития БА до сих пор не установлены, однако, согласно одной из гипотез первичной причиной гибели нейронов и нейрональной деструкции является β-амилоид

(Аβ) [1,2]. Аβ представляет собой пептид, содержащий от 36 до 43 аминокислот, который образуется в результате последовательного протеолиза белка предшественника амилоида (БПА). Наиболее токсичной формой считают β-амилоид, пептидная цепочка которого состоит из 42 аминокислот (Аβ42) [3,4]. Он оказывает широкий спектр цитотоксического действия на нейроны, глиальные клетки, а также приводит к дисфункции гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). Известно, что аккумуляция Аβ42 в околососудистой зоне приводит к усилению трансмиграции иммунокомпетентных клеток крови в паренхиму мозга и воспалению [5,6].

Трансмиграция воспалительных клеток из кровяного русла в паренхиму органа сложный многоступенчатый процесс, который начинается с адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Такое взаимодействие осуществляется с помощью факторов активации клеток и молекул клеточной адгезии – селектинов [7]. Белки семейства селектинов это трансмембранные гликопротеины состоящие из одной полипептидной цепи. В данном семействе выделяют три типа белков Р – , Е – и L – селектин. Последний синтезируется только в лейкоцитах, тогда как первые два на поверхности эндотелиоцитов [8]. В эндотелиоцитах оба селектина выполняют схожие функции, однако, в отличие от Е-селектина, который синтезируется *de novo* только через несколько часов после активации, Р-селектин содержится в клетке внутри цитоплазматических гранул, называемых тельцами Вейбеля-Паладе (ТВП) [9,10]. Благодаря этому Р-селектин, под влиянием различных воспалительных факторов, таких как тромбин, брадикинин и гистамин, может быстро, в течение нескольких минут, мобилизоваться на поверхности эндотелиоцита [9]. Таким образом в раннем адгезивном взаимодействии лейкоцитов с эндотелиальными клетками, основная роль отводится именно Р-селектину [7,11].

Известно, что наряду с провоспалительными цитокинами, Аβ42 также способен активировать эндотелиальные клетки, индуцировать транслокацию Р-селектина на плазматической мембране и полимеризацию актина, способствуя таким образом, адгезии лейкоцитов с эндотелиоцитами [12,13]. Однако, с помощью каких механизмов Аβ42 индуцирует мобилизацию Р-селектина и полимеризацию актина неизвестно. В настоящем

исследовании нами была изучена роль активных форм кислорода (АФК) в полимеризации актина и мобилизации Р-селектина на поверхности эндотелиальных клеток при воздействии Аβ42.

Материалы и методы

Культивирование клеток

В настоящем исследовании использовали культуру нейроваскулярных эндотелиоцитов мышей линии bEnd3 (ATCC). Клетки культивировали на покровных стеклах в стандартной среде DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки и 1% пеницилин-стрептомицина в CO₂-инкубаторе (содержание CO₂ – 5%, температура – 37°C). Клетки, которые подвергались воздействию β-амилоида, инкубировали в такой же среде с добавлением олигомеров Аβ42 в концентрации 5 мкМ [12]. Для приготовления олигомеров Аβ42, 1 мг мономеров Аβ42 (American Peptides Company) растворяли в 200 мкл of 100% 1,1,1,3,3,3 гексафлюоро-2-пропанол (HFIP) и разливали в 1,5 мл микропробирки по 10 мкл. Затем HFIP испаряли в вакуумной центрифуге в течение 1,5 часов и сохраняли при -86 °C [21]. Перед использованием в пробирку с осажденным Аβ42 добавляли 2 мкл диметилсульфоксида с последующим разведением до концентрации 100 мкМ в охлажденной культуральной среде Ham's, а затем обрабатывали ультразвуком в течение минуты. Далее для получения олигомеров Аβ42 приготовленный раствор β-амилоида инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов [13], наличие олигомеров Аβ42 после инкубации подтверждали с помощью метода вестерн блоттинга.

Клетки bEnd3 были разбиты на следующие группы: контроль (интактные клетки); клетки которые инкубировали с Аβ42 в течение 10, 30 и 60 минут; клетки которые инкубировали с 30 мМ антиоксиданта N-ацетилцистеина (НАС) в течение 60 минут; клетки, которые инкубировали сначала с НАС, а затем с Аβ42 в тех же условиях, что и в предыдущих группах; клетки, которые инкубировали с перекисью водорода (0,5 мМ) в течение 10, 30 и 60 минут. Концентрация НАС подбиралась, основываясь на опубликованных ранее работах [14,15].

Метод определения АФК в клетках

Для количественной оценки уровня АФК в клетках использовали метод флуоресцентного окрашивания супероксид аниона красителем DHE [16]. Метод основан на способности кра-

сителя реагировать с $O_2 \bullet^-$, в результате реакции ДНЕ преобразуется в оксизитидиум (оxу-Е), который обладает флуоресцентными свойствами, и интеркалирует в ДНК клетки. Для анализа количества АФК, клетки инкубировали в среде с ДНЕ в концентрации 20 мкМ в течение 2 часов параллельно с Аβ42, после чего микрофотографировали.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для выявления Р-селектина и F-актина использовали метод иммунофлуоресценции. После воздействия Аβ42, клетки фиксировали в 3,7% формалине в течение 30 мин, промывали в фосфатном буфере (рН 7,4) 3 раза по 10 минут и инкубировали с антителами. Для исключения неспецифического связывания антител, после фиксации, клетки инкубировали в 5% растворе сывороточного альбумина в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем метили Р-селектин первичными антителами (Santa Cruz, 1:200) в течение 12 часов при температуре 4°C, после чего клетки промывали фосфатным буфером 3 раза по 10 минут и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флюорофором (Invitrogen, Alexa 594, 1:1000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для измерения полимеризации актина, после фиксации клеток, проводили пермеабиллизацию мембран с помощью 0,1% раствора Тритона X-100 в фосфатном буфере в течение 5 минут. После чего клетки промывали в фосфатном буфере три раза по 5 минут и инкубировали с красителем Oregon-green phalloidin (250 mM) (Invitrogen) в фосфатном буфере содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина при комнатной температуре в течение 1 часа. Для визуализации ядра клетки окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) в концентрации 300 нМ в течение 5 минут. После чего покровные стекла монтировали на предметные стекла с помощью специальной жидкости с низким коэффициентом преломления «Fluoromount» (Sigma) и микрофотографировали.

Количественная флуоресценция

Качественную визуальную и количественную оценку интенсивности флуоресценции красителей, специфически связанных с маркерами АФК, Р-селектином и актином, производили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer Z1 (объектив 40X, NA 0.95) снабженного ПЗС-фотокамерой

и программой Meta Morph. Для получения флуоресцентных изображений АФК, Р-селектина и актина использовали параметры экспозиции 400 миллисекунд. Количественную оценку производили путем определения интенсивности свечения меченых маркеров в клетках. Измерение производили примерно в 500 клетках в каждой группе исследований.

Метод вестерн блоттинга

Содержание Р-селектина в лизате нейроваскулярных эндотелиоцитов оценивали с помощью белкового иммуноблоттинга. Для получения лизата из эндотелиоцитов опытных и контрольных групп в культуральные чашки Петри добавляли по 300 мкл буфера Laemmli (Sigma Aldrich, США). Лизат собирали в 1,5 мл пробирки, обрабатывали ультразвуком и добавляли 7,5 мкл 2-меркаптоэтанола (Sigma Aldrich), затем кипятили при 95°C в течение 5 минут. Полученный экстракт разливали в ячейки 10% SDS PAGE геля, по 40 мкл в каждую, после чего его разделяли электрофорезом. Разделенные электрофорезом белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в трис-глициновом буфере (рН 8,3), содержащем 0,1% додецил-сульфат натрия и 20% метанола в течение 12 часов при силе тока 90 мА и температуре 4°C. После чего мембраны, содержащие белок, для предотвращения неспецифического связывания антител, инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока в TBS-T буфере (трис-буферный раствор содержащий 1% Tween 20) в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем мембраны инкубировали с первичными антителами, специфичными к Р-селектину, при t 4°C в течение 12 часов (1:600; Cell Signaling Technology), промывали в TBS-T буфере 3 раза по 10 минут и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000; Santa Cruz) при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве стандартного протеина использовали β-актин, который метили антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:50000 (Molecular Probes, США). Затем мембраны снова промывали в TBS-T буфере. Визуализацию пероксидазной реакции проводили методом хемилуминесценции с использованием субстрата, содержащего люминол (Thermo Sci-SuperSignal West Pico и West Femto). Для этого мембраны инкубировали с субстратом в течение 5 минут, затем покрывали прозрачной пленкой

А.

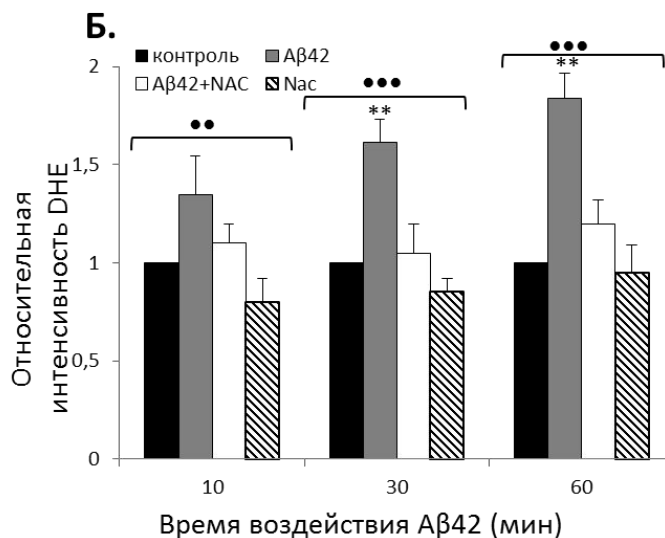
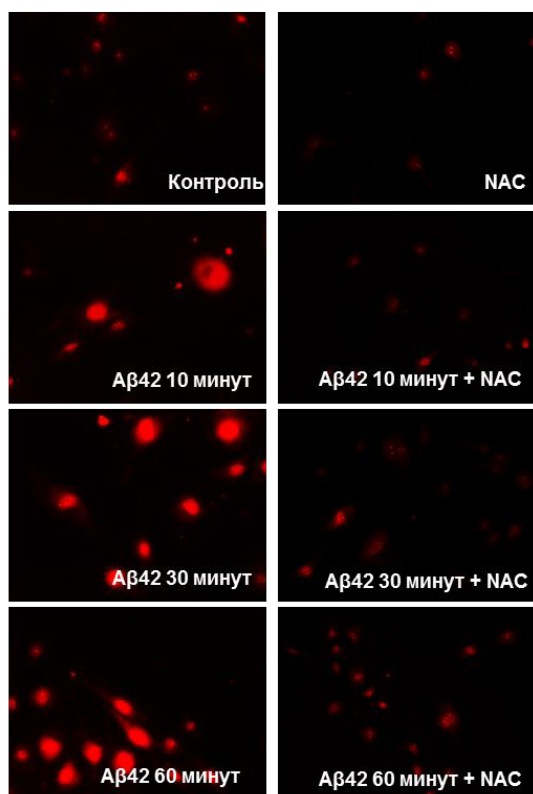


Рисунок 1 – Генерация АФК в bEnd3 клетках при воздействии Аβ42.

Флуоресценция bEnd3 клеток (А); содержание АФК (Б).

** - $p \leq 0,01$ по сравнению с контролем; *** - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,01$ (One Way ANOVA).

(3Com) и совмещали с фотопластинкой. Время экспозиции составляло от 2 до 5 минут. Для количественной оценки белка, содержащегося на мембране, полученные негативы сканировали и измеряли оптическую плотность (на уровне 140 кДа для Р-селектина и 43 кДа для β-актина) засвеченных полосок (бэнд), используя программу Quantity One (BioRAD, Hercules, США). Количество Р-селектина в клетке рассчитывали по формуле $A/B=C$: где А – оптическая плотность бэнда Р-селектина; В – оптическая плотность бэнда β-актина и С – содержание Р-селектина.

Статистический анализ

Полученные данные представлены в виде средней величины \pm стандартная погрешность. Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Значения считались достоверно различными при $p \leq 0,05$. Анализ данных осуществляли с использо-

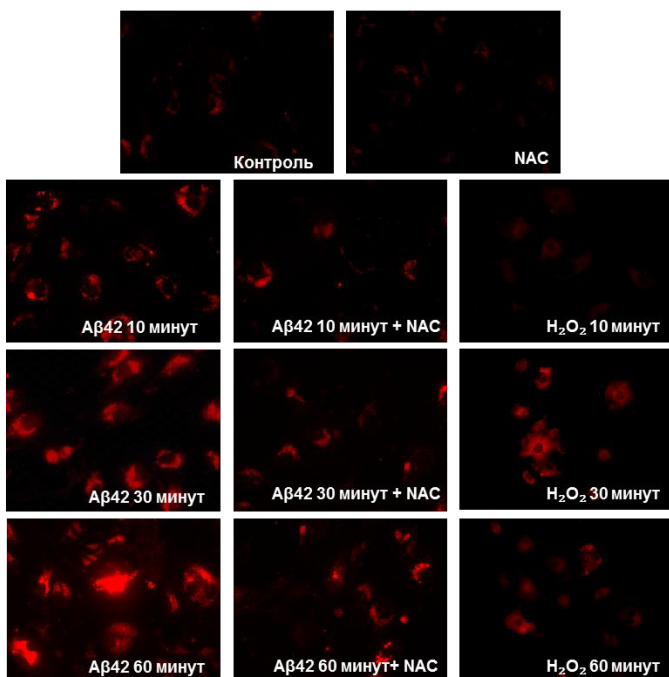
ванием программы для статистического анализа Sigma Plot 11. Каждый эксперимент проводили как минимум в три раза.

Результаты и обсуждение

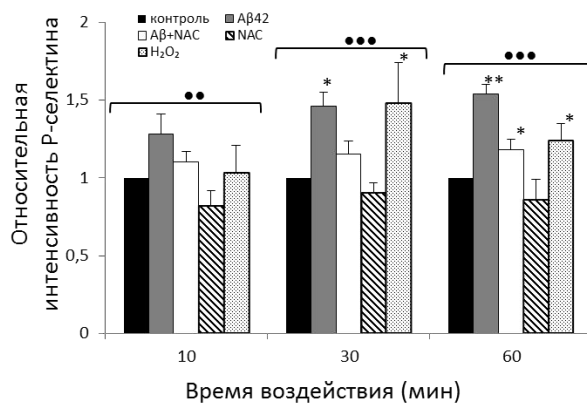
Результаты количественного флуоресцентного анализа уровня генерации АФК в эндотелиоцитах представлены на рисунке 1 (А, Б). Видно, что при воздействии Аβ42 в течение 10, 30 и 60 минут количество АФК возрастало на 34,5%, 61% и 83% соответственно. Напротив, в клетках, которые предварительно инкубировали с антиоксидантом NAC, а затем с Аβ42, или только с NAC, количество АФК статистически не отличалось от контрольных величин.

Результаты количественного анализа Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов представлены на рисунке 2 (А, Б, С). Проведенный анализ показал, что содержание Р-селектина на поверхности клеток возрастало на 28%, 46%, 54% при 10, 30 и 60 минутах воздействия Аβ42 соответственно. Напротив, в клетках, которые

А.



Б.



С.

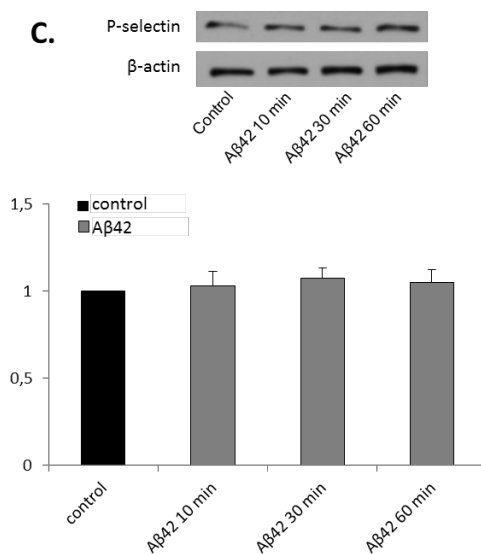


Рисунок 2 – Воздействие Aβ42 на содержание Р-селектина на поверхности bEnd3 клеток. Флуоресценция Р-селектина (А); содержание меченого Р-селектина (Б); определение Р-селектина в bEnd3 клетках методом вестерн блоттинга (С). ** - $p \leq 0,01$, *- $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем, *** - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,01$ (One Way ANOVA).

инкубировали с антиоксидантом NAC, а затем с Aβ42 или только с NAC, значительных изменений в содержании Р-селектина не наблюдалось (рисунок 2, Б). Как позитивный контроль H₂O₂ также увеличивал экспрессию Р-селектина на поверхности клеток, с максимальным пиком

флуоресценции после 30 минут воздействия. Результаты анализа методом вестерн блоттинг показали, что при воздействии Aβ42 содержание общего Р-селектина в эндотелиоцитах не менялось (рисунок 2,С). Результаты количественной оценки уровня F-актина представлены на рисун-

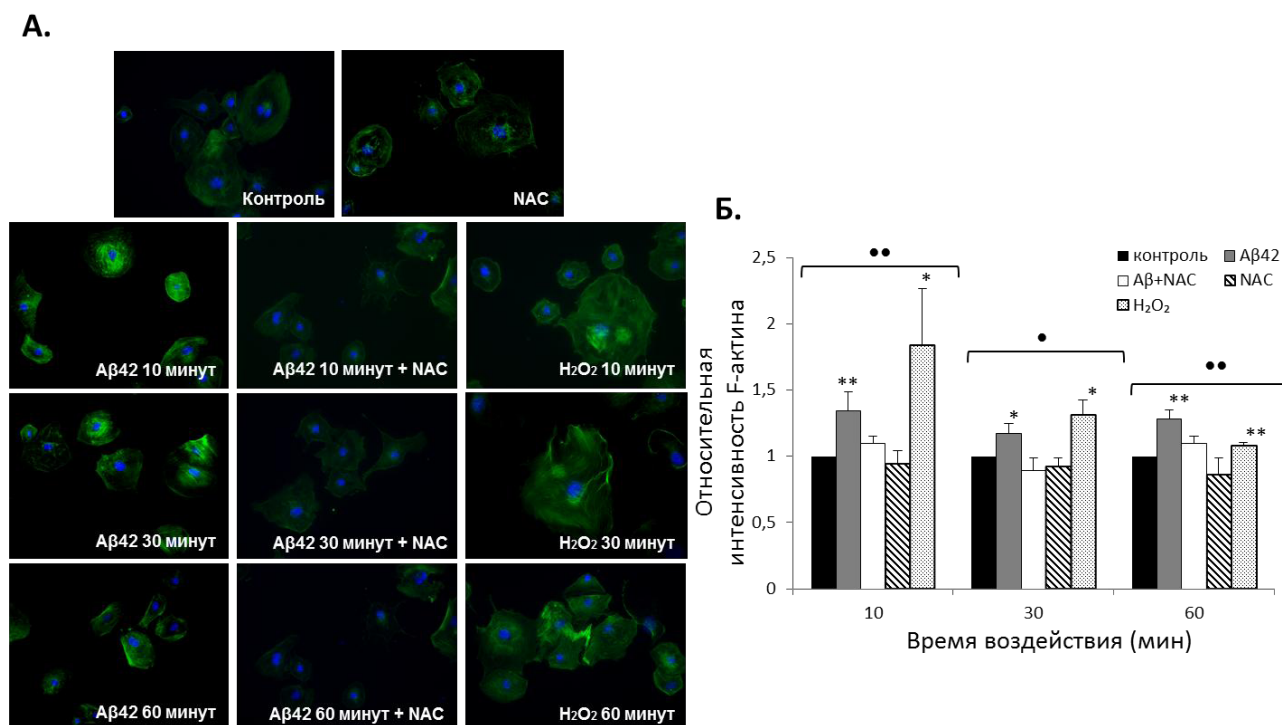


Рисунок 3 – Воздействие Aβ42 на полимеризацию актина в bEnd3 клетках.

Флуоресценция F-актина (А); содержание F-актина (Б). ** - $p \leq 0,01$;

* - $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем. •• - $p \leq 0,01$, • - $p \leq 0,05$ (One Way ANOVA).

ке 3 (А, Б). Видно, что при воздействии Aβ42 и перекиси водорода уровень полимеризации актина возрастал. В клетках, которые предварительно инкубировали с NAC, а затем с Aβ42 уровень F-актина практически не изменялся. Инкубирование клеток только с антиоксидантом NAC не приводило к значительному изменению уровня полимеризации актина.

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что Aβ42, также как и экзогенные кислородные радикалы (перекись водорода), приводит к аккумуляции Р-селектина на плазматической мембране нейроvascularных эндотелиоцитов и индуцирует полимеризацию актина внутри клеток.

Как уже упоминалось ранее, Р-селектин содержится в специальных везикулах ТВП цитоплазматической фракции эндотелиоцитов. Кроме того, известно, что в норме данный рецептор отсутствует на плазматической мембране эндотелиальных клеток. Однако при индукции провоспалительными цитокинами происходит его быстрая мобилизация на поверхность клетки и

уже через 10 минут после активации на плазматической мембране отмечается максимальный уровень Р-селектина. Примерно через 30 минут данный рецептор клеточной адгезии почти полностью удаляется с поверхности клетки с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза [9]. В дальнейшем, при необходимости, синтез данного белка de novo начинается только спустя два часа после индукции некоторыми цитокинами, такими как интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли-α. В настоящем исследовании нами было показано, что воздействие Aβ42 в течение 60 минут не влияло на синтез Р-селектина и об этом свидетельствовали результаты вестерн-блоттинга. Напротив, флуоресцентный анализ показал, что уже после 10 минут воздействия как Aβ42, так и H₂O₂, количество Р-селектина на поверхности клеток возрастало. Более того, через 30 и 60 минут его количество не только не снижалось, но и постоянно возрастало.

Возможным регулирующим фактором мобилизации Р-селектина на поверхности нейроvascularных эндотелиоцитов является генерация

АФК. Исследование, проведенное на эндотелиоцитах сосудов пуповины человека (HUVES), показало, что молекулы АФК являлись ключевым фактором в индуцированной тромбином транслокации Р-селектина. Ингибирование активности НАДФН оксидазы или инкубирование HUVES клеток с антиоксидантами приводило к снижению количества Р-селектина на их поверхности [17]. В настоящем исследовании нами было показано, что воздействие Аβ42 приводило к увеличению уровня генерации АФК и аккумуляции Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов, причем прямо пропорционально длительности воздействия. Подобная динамика Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов наблюдалась и при воздействии перекисью водорода. В тоже время, антиоксидант НАС снижал уровень АФК и содержание Р-селектина на поверхности клеток. Данные наблюдения позволили нам заключить, что Аβ42 индуцирует мобилизацию Р-селектина на поверхность клеток, хотя бы частично, через генерацию АФК.

АФК в клетках может вырабатываться за счет работы различных ферментных комплексов. В нейроваскулярных эндотелиоцитах и астроцитах основным источником кислородных радикалов является НАДФН оксидаза [18-20]. В связи с этим, можно предположить, что воздействие Аβ42 на эндотелиоциты приводит к активации НАДФН оксидазы и генерации кислородных радикалов, которые, в свою очередь, активируют сигнальные пути, контролируемые быструю мобилизацию Р-селектина на плазматической мембране.

Интересным также является тот факт, что молекулы АФК играют немаловажную роль в различных стадиях высвобождения содержимого гранул ТВП [21-23]. В частности, N-этилталеимид чувствительный фактор (NSF) является цитозольной АТФ-азой и играет ключевую роль в слиянии ТВП с плазматической мембраной [24]. Известно, что S-нитрозилирование фактора NSF молекулами NO ингибирует его активность [25]. Кислородные радикалы, в свою очередь, способны прямо, путем непосредственного взаимодействия, или опосредовано, путем модификаций белков-мишеней, блокировать действие NO [26,27], и поэтому могут влиять на активацию экзоцитоза гранул ТВП.

Помимо АФК, активное участие в поздних стадиях экзоцитоза телец ТВП принимают актиновые филаменты. Какая-то часть ТВП ассоциирована с актиновым кортексом, и как предполагают, это и есть пул зрелых везикул, который, при необходимости, может быстро высвобождать свое содержимое на поверхность эндотелиоцитов [28,29]. Кроме того, в активированных эндотелиоцитах актиновые компоненты цитоскелета формируют стресс-фибриллы, и это приводит к снижению контактов между клетками эндотелия, способствуя появлению фенестраций и увеличивая таким образом трансваскулярный трафик мигрирующих лейкоцитов [30]. Ранее проведенные исследования на нейронах и нейроваскулярных эндотелиоцитах показали, что олигомеры Аβ влияют на полимеризацию актина [31,32]. Наши данные, также свидетельствуют в пользу данного утверждения и показывают, что Аβ42 индуцируют формирование F-актина в bEnd3 клетках. Более того, исходя из полученных результатов можно заключить, что, вероятно, АФК является регулятором перестройки актиновых компонентов цитоскелета [33]. Согласно проведенным ранее исследованиям, АФК влияет на скорость полимеризации актина через прямую регуляцию разборки микрофиламентов и через контроль актин-деполимеризационных факторов [34]. В настоящем исследовании нами было показано, что воздействие Аβ42, равно как и H₂O₂, приводило к полимеризации актина, а антиоксидант НАС нейтрализовал такое действие Аβ42 и снижая уровень F-актина. Исходя из вышесказанного логично предположить, что, Аβ42 индуцирует полимеризацию актина через АФК зависимый механизм.

Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что Аβ42 индуцирует аккумуляцию Р-селектина на поверхности bEnd3 клеток и активирует полимеризацию актина, и все эти события находятся в тесной корреляции с генерацией АФК. Быстрый посттрансляционный ответ клеток, опосредованный кислородными радикалами, может представлять собой важный физиологический процесс в микрососудистом воспалительном ответе и требует дальнейших исследований.

Литература

- 1 Selkoe D.J.a.S., D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* -2003. № 43. – P. 545-84.
- 2 Ferreira S.T., Klein W.L. The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease // *Neurobiol Learn Mem.* -2011. -Vol. 96, № 4. – P. 529-43.
- 3 Klein W.L., Stine Jr W.B., Teplow D.B. Small assemblies of unmodified amyloid β -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease // *Challenging Views of Alzheimer's Disease – Round II.* -2004. -Vol. 25, № 5. – P. 569-580.
- 4 Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Rowan M.J., Selkoe D.J. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition // *Biochem Soc Trans.* -2002. -Vol. 30, № 4. – P. 552-7.
- 5 Rogers J., Shen Y. A Perspective on Inflammation in Alzheimer's Disease // *Annals of the New York Academy of Sciences.* -2000. -Vol. 924, № 1. – P. 132-135.
- 6 Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated // *Nat Rev Immunol.* -2007. -Vol. 7, № 9. – P. 678-89.
- 7 Rossi B., Angiari S., Zenaro E., Budui S.L., Constantin G. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions // *Journal of leukocyte biology.* -2011. -Vol. 89, № 4. – P. 539-56.
- 8 Bernardes-Silva M., Anthony D.C., Issekutz A.C., Perry V.H. Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of E- and P-selectins // *J Cereb Blood Flow Metab.* -2001. -Vol. 21, № 9. – P. 1115-24.
- 9 Vestweber D., Blanks J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands // *Physiol Rev.* -1999. -Vol. 79, № 1. – P. 181-213.
- 10 Wagner D.D. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin // *Thromb Haemost.* -1993. -Vol. 70, № 1. – P. 105-10.
- 11 Jones D.A., Abbassi O., McIntire L.V., McEver R.P., Smith C.W. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells // *Biophysical journal.* -1993. -Vol. 65, № 4. – P. 1560-9.
- 12 Askarova S. S.Z., Sun G.Y., Meininger G.A., Lee J. C-M. Amyloid- β Peptide on Sialyl-LewisX-Selectin-Mediated Membrane Tether Mechanics at the Cerebral Endothelial Cell Surface // *PLoS ONE.* -2013. -Vol. 8(4).
- 13 Gonzalez-Velasquez F.J., Moss M.A. Soluble aggregates of the amyloid-beta protein activate endothelial monolayers for adhesion and subsequent transmigration of monocyte cells // *J Neurochem.* -2008. -Vol. 104, № 2. – P. 500-13.
- 14 Bouloumie A., Marumo T., Lafontan M., Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells // *FASEB J.* -1999. -Vol. 13, № 10. – P. 1231-8.
- 15 Yao K., Ge J.B., Sun A.J., Hong X.W., Shi H.Y., Huang R.C., Jia Q.Z., Wang K.Q., Zhong C.P., Cao X.T., Zou Y.Z. [Effects and mechanism of hyperglycemia on development and maturation and immune function of human monocyte derived dendritic cells] // *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* -2006. -Vol. 34, № 1. – P. 60-4.
- 16 Zanetti M., d'Uscio L.V., Peterson T.E., Katusic Z.S., O'Brien T. Analysis of Superoxide Anion Production in Tissue // *Hypertension*, 2005. – P. 65-72.
- 17 Takano M., Meneshian A., Sheikh E., Yamakawa Y., Wilkins K.B., Hopkins E.A., Bulkley G.B. Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* -2002. -Vol. 283, № 5. – P. H2054-61.
- 18 Cai H., Griendling K.K., Harrison D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases // *Trends in Pharmacological Sciences.* -2003. -Vol. 24, № 9. – P. 471-478.
- 19 Park L., Anrather J., Zhou P., Frys K., Pitsstick R., Younkin S., Carlson G.A., Iadecola C. NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Mediate the Cerebrovascular Dysfunction Induced by the Amyloid -beta- Peptide // *J. Neurosci.* -2005. -Vol. 25, № 7. – P. 1769-1777.
- 20 Askarova S., Yang X., Sheng W., Sun G.Y., Lee J.C. Role of Abeta-receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A(2) activation in astrocytes and cerebral endothelial cells // *Neuroscience.* -2011. -Vol. 199. – P. 375-85.
- 21 Lowenstein C.J., Morrell C.N., Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis // *Trends in cardiovascular medicine.* -2005. -Vol. 15, № 8. – P. 302-8.
- 22 Johnson J.L., Monfregola J., Napolitano G., Kiosses W.B., Catz S.D. Vesicular trafficking through cortical actin during exocytosis is regulated by the Rab27a effector JFC1/Slp1 and the RhoA-GTPase-activating protein Gem-interacting protein // *Mol Biol Cell.* -2012. -Vol. 23, № 10. – P. 1902-16.
- 23 Yang S.X., Yan J., Deshpande S.S., Irani K., Lowenstein C.J. Rac1 regulates the release of Weibel-Palade Bodies in human aortic endothelial cells // *Chinese medical journal.* -2004. -Vol. 117, № 8. – P. 1143-50.
- 24 Yamakuchi M., Ferlito M., Morrell C.N., Matsushita K., Fletcher C.A., Cao W., Lowenstein C.J. Exocytosis of Endothelial Cells Is Regulated by N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor // *Methods Mol Biol.* -2008. -Vol. 440. – P. 203-15.
- 25 Matsushita K., Morrell C.N., Cambien B., Yang S.X., Yamakuchi M., Bao C., Hara M.R., Quick R.A., Cao W., O'Rourke B., Lowenstein J.M., Pevsner J., Wagner D.D., Lowenstein C.J. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor // *Cell.* -2003. -Vol. 115, № 2. – P. 139-50.
- 26 Morrell C.N. Reactive oxygen species: finding the right balance // *Circ Res.* -2008. -Vol. 103, № 6. – P. 571-2.
- 27 Matsushita K., Morrell C.N., Mason R.J., Yamakuchi M., Khanday F.A., Irani K., Lowenstein C.J. Hydrogen peroxide regulation of endothelial exocytosis by inhibition of N-ethylmaleimide sensitive factor // *J Cell Biol.* -2005. -Vol. 170, № 1. – P. 73-9.

- 28 Rondaj M.G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J.A., Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* -2006. -Vol. 26, № 5. – P. 1002-7.
- 29 Metcalf D.J., Nightingale T.D., Zenner H.L., Lui-Roberts W.W., Cutler D.F. Formation and function of Weibel-Palade bodies // *Journal of cell science.* -2008. -Vol. 121, № Pt 1. – P. 19-27.
- 30 Kluger M.S. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment // *Adv Dermatol.* -2004. -Vol. 20. – P. 163-201.
- 31 Cheng S., George P., Dechun W., Ya Fang L. Beta-Amyloid peptide induces formation of actin stress fibers through p38 mitogen-activated protein kinase // *Journal of Neurochemistry.* -2002. -Vol. 83, № 4. – P. 828-836.
- 32 Askarova S e.a. Effects of Oligomeric Amyloid β Peptide on the Adhesion Mechanics of Cerebral Endothelium. 2009.
- 33 Zhu D., Tan K.S., Zhang X., Sun A.Y., Sun G.Y., Lee J.C. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes // *Journal of cell science.* -2005. -Vol. 118, № Pt 16. – P. 3695-703.
- 34 Moldovan L., Moldovan N.I., Sohn R.H., Parikh S.A., Goldschmidt-Clermont P.J. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics // *Circulation research.* -2000. -Vol. 86, № 5. - P. 549-57.