БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 2, с. 147 – 157

УДК 576.08/612.115.35/54-39

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНЪЮГИРОВАННОГО С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКОЙ АПТАМЕРА ARC1779 ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ H_2O_2 НА ЭКЗОЦИТОЗ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА*

© 2021 П.П. Авдонин[1], С.К. Труфанов[1], А.А. Цитрина[1], Е.Ю. Рыбакова[1], Н.В. Гончаров[2,3], П.В. Авдонин[1]**

[1] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: pvavdonin@yandex.ru*

[2] *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия*

[3] *НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, 188663 пос. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия*

Поступила в редакцию 05.06.2020
После доработки 15.10.2020
Принята к публикации 15.10.2020

Предложен новый подход для количественного определения экспонированного на поверхности эндотелиальных клеток (ЭК) фактора Виллебранда (ФВ) с использованием аптамера ARC1779, взаимодействующего с доменом A1 в структуре ФВ. Для визуализации образующегося комплекса ФВ с аптамером к молекуле последнего была присоединена флуоресцентная метка Cy5. Культивируемые ЭК из пупочной вены человека прижизненно окрашивали конъюгатом ARC1779-Cy5, и снимали изображение с помощью флуоресцентного микроскопа. Анализ изображения проводили с помощью программы CellProfiler. Мультимерные комплексы ФВ, секретируемые тельцами Вейбеля–Паладе, при окраске конъюгатом ARC1779-Cy5 видны под микроскопом как яркие точечные структуры округлой и неправильной формы. Число этих структур многократно увеличивается при воздействии на ЭК активаторов секреции ФВ, гистамина и тромбина. Кроме того, ARC1779-Cy5 выявляет на поверхности активированных ЭК гигантские мультимеры ФВ, развёрнутые в виде длинных нитей. Секрецию ФВ в ЭК активируют вторичные мессенджеры – cAMP и Ca^{2+}. Есть свидетельства, что пероксид водорода в ЭК также выполняет функцию вторичного мессенджера. Кроме того, в ЭК поступает экзогенный H_2O_2, образующийся в лейкоцитах. Задачей работы было, используя предложенный метод, определить, какое влияние H_2O_2 оказывает на экспрессию ФВ на поверхности ЭК. Показано, что пероксид водорода при концентрации 100 мкМ (ниже цитотоксической) в несколько раз увеличивает количество экспонированных на плазматической мембране точечных структур ФВ. Полученные данные свидетельствуют о роли H_2O_2 в качестве посредника, активирующего экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе и секрецию ФВ в эндотелии сосудов при воспалении и при индукции образования эндогенных активных форм кислорода в ЭК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор Виллебранда, аптамеры, пероксид водорода, эндотелиальные клетки, секреция.

DOI: 10.31857/S0320972521020019

ВВЕДЕНИЕ

Более половины всех фармакологических препаратов являются лигандами мембранных рецепторов и других белков [1, 2]. Это в абсолютном большинстве низкомолекулярные вещества природного происхождения или искусственные синтетические соединения. Почти все они не обладают полной избирательностью и, как правило, действуют на несколько мишеней в клетках. С появлением методов генной инженерии и молекулярной иммунологии стало интенсивно развиваться новое направление в фармакологии – создание исключительно специфичных лекарственных препаратов на основе гуманизированных антител. Разработаны антитела против рецепторов, компонентов системы комплемента и т.д. Присоединение к антителам маркеров и токсических компонентов позволило использовать их одновременно и как диагностический препарат, и как лекарство. Данный подход является основой для нового направления в биомедицинских исследованиях – тераностики. Антитело используется как «якорь», к которому присоединяется конструкция, несу-

Принятые сокращения: ФВ – фактор Виллебранда; ЭК – эндотелиальные клетки.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 2, 2021.

** Адресат для корреспонденции.

щая метку для визуализации патологического очага, и компонент, осуществляющий терапевтическое воздействие [3].

В 1990 г. был предложен метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) для создания аптамеров – коротких одноцепочечных олигонуклеотидов ДНК или РНК с уникальными последовательностями, способных с высоким сродством и специфичностью связываться с мишенями разного типа: белками, полисахаридами, локализованными на клеточной поверхности, с низкомолекулярными соединениями, ионами металлов и другими [4–7]. По аффинности и избирательности действия аптамеры не уступают антителам. Разработан подход для селекции аптамеров против отдельных видов клеток, включая раковые [8]. Проводятся клинические испытания аптамеров, предназначенных для лечения онкологических заболеваний и болезней крови [9, 10]. Аптамеры имеют ряд преимуществ по сравнению с антителами. Их структура воспроизводима, они термостабильны, менее иммуногенны и могут храниться в сухом виде неограниченное время [10]. Показана возможность использования аптамеров вместо антител в гистохимических исследованиях [11] и для проточной цитофлуориметрии [12].

Одной из мишеней для антител и аптамеров является фактор Виллебранда (ФВ). Это важнейший гликопротеин плазмы крови, секретируемый эндотелиальными клетками (ЭК) (в меньшей степени тромбоцитами) и обеспечивающий поддержание гемостаза. ФВ поступает в кровь из ЭК в виде популяции гигантских линейных мультимерных молекул молекулярной массой до 20 000 кДа, которые образованы из мономеров ~250 кДа, соединённых дисульфидными связями [13]. В молекуле ФВ имеются регулярно повторяющиеся структурные домены A1, обеспечивающие его взаимодействие с гликопротеином 1b на мембране тромбоцитов. Присоединение тромбоцитов к развернутым молекулам ФВ по этому домену инициирует образование тромбов в артериолах и капиллярах при их повреждении и остановку кровотечения. Избыточное образование ФВ или его повышенная активность, вызванная мутациями, приводит к патологическому тромбообразованию в микрососудах и развитию тромботических микроангиопатий. Создан фармакологический препарат «Caplacizumab» на основе наноантитела против домена A1 в молекуле ФВ [14], применяемый для лечения тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Параллельно с этим разработан также связывающийся с A1 аптамер ARC1779, показавший эффективность при лечении болезни Виллебранда типа 2B [15–17]. Метод SELEX усовершенствован благодаря использованию при получении библиотек олигонуклеотидов со случайными (random) последовательностями искусственного пятого нуклеотида (ExSELEX), и таким образом был синтезирован новый ещё более эффективный аптамер против ФВ [18].

Помимо применения в качестве фармпрепаратов, низкомолекулярные лиганды и антитела широко используются для проведения биологических исследований мембранных рецепторов и внутриклеточных белков. Метод иммунофлуоресцентного окрашивания антителами позволяет оценивать локализацию и уровень экспрессии белков на плазматической мембране и внутри клетки. Один из вопросов, требующих более глубокого изучения, касается механизмов регуляции секреции ФВ эндотелиальными клетками. Антитела против ФВ позволяют оценивать его экспонирование на поверхности плазматической мембраны. При этом проводится инкубация фиксированных ЭК с первичными антителами и после этого с флуоресцентно окрашенными вторичными антителами [19]. В настоящей работе нами впервые был применен подход с определением экзоцитоза ФВ с помощью флуоресцентно-меченного аптамера. С этой целью был использован аптамер ARC1779 с присоединенным к его молекуле флуоресцентным красителем Cy5. В настоящее время разработано несколько аптамеров, присоединяющихся к ФВ по домену A1 и блокирующих его взаимодействие с тромбоцитами [17, 18, 20, 21], однако пока только ARC1779 получил применение в качестве лекарственного препарата. Используя конъюгат ARC1779-Cy5, нам удалось наблюдать за раскрытием на поверхности ЭК отдельных секреторных везикул и исследовать регуляцию этого процесса непосредственно в живых клетках. Мы показали, что пероксид водорода в концентрациях, в которых он может накапливаться в сосудах, стимулирует экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе и экспонирование ФВ на плазматической мембране ЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭК выделяли из пупочной вены человека по методике, описанной ранее [22], и культивировали в среде M199, содержащей 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота («Sigma-Aldrich», США) и эндотелиальную ростовую добавку, полученную из замороженных мозгов кролика (ООО «Кролинфо», д. Новая, Московская обл., Россия) по методу Maciag et al. [23].

Клетки идентифицировали по морфологическим критериям: наличию ФВ, ангиотензинпревращающего фермента и поверхностных белков CD31, CD54, CD61 [24]. ЭК культивировали в атмосфере, содержавшей 5% CO_2. В работе использовали клетки 2–4 пассажей. Для снятия клеток при пассировании применяли реагент аккутазу («Sigma-Aldrich», США).

Для окрашивания ФВ использовали аптамер ARC1779 (патент US20090203766A1, «Archemix Corp.», США) с присоединённым к нему по 5′-концу красителем Cy5 (Cy5-mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-dTmGdCdGdGdTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC, где «m» – 2′-OMe, «s» – фосфоротиоатная связь). В качестве контроля был взят олигонуклеотид Cy5-mGmGmCmCdAdGdCmCmUmCmUmCmCmUmGmGmUmGdGmG-s-TmCdGdCdCTmAmGdGmUdCdGmGmGdCmCmCmCmU со случайной последовательностью, но с таким же соотношением нуклеотидов, как у ARC1779. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «ДНК-синтез», Россия.

При определении действия гистамина (100 мкМ), тромбина (1 ед./мл) или пероксида водорода (100 мкМ) на экзоцитоз ФВ выращенные в 24-луночном планшете ЭК отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (PSS, pH 7,4), содержавшим 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$ и 10 мМ глюкозы. Клетки инкубировали в отсутствии или в присутствии активатора при 32–34 °C в течение 20 мин. После этого внеклеточную жидкость отбирали, и добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора 250 нМ ARC1779-Cy5 в среде гибридизации, содержащей 0,1 мг/мл tRNA («RocheDiagnostics», Швейцария), 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, «Amresco», США), 5 мМ $MgCl_2$, 25 мМ глюкозы, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ KH_2PO_4, 136,9 мМ NaCl, 8,10 мМ Na_2HPO_4, после чего инкубировали 20 мин при 32 °C. Для окрашивания ядер в среду добавляли 1 мкг/мл Hoechst 33342 («ThermoFisher Scientific», США). По окончании инкубации клетки 2 раза промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) («ThermoFisher Scientific», США) для удаления не связавшегося ARC1779-Cy5. К клеткам добавляли 200 мкл FluoroBriteTM DMEM («ThermoFisher Scientific», США), и сразу после этого снимали изображение окрашенных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 с использованием объектива HCX PL FLUOTAR L 20,0 × 0,40 DRY, диодных осветителей с длинами волн 385 и 620 нм и фильтров A4 и TX2 («Leica», ФРГ). Расчёт общей интенсивности флуоресценции и средних значений числа частиц ФВ в пересчете на число окрашенных ядер проводили после обработки мозаичных изображений с участков площадью 1,5 × 2 мм в шести контрольных и шести опытных лунках. Число клеток на участке данной площади составляло 2800–3000. Изображения анализировались с помощью программы CellProfiler [25], находящейся в открытом доступе (http://cellprofiler.org/releases). Более подробное описание применения этой программы для анализа изображения ЭК приведено ранее [26]. Общее количество анализируемых кадров составляло 96–128 (по 16 кадров из каждой лунки в 48-луночном планшете). Для получения приведенных в статье данных проводилось не менее трех независимых экспериментов на разных препаратах ЭК. Проводилось определение общего количества экспонированных на поверхности ЭК окрашенных ARC1779-Cy5 структур ФВ и их средней яркости (интенсивность флуоресценции в пересчете на отдельную клетку). Данные представлены в относительных единицах. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий определяли с использованием критерия Стьюдента с помощью программы Excel, а также однофакторного дисперсионного анализа с помощью программы MedCalc («MedCalc Software Ltd», Бельгия).

Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировались 4%-ным параформальдегидом в PBS в течение 20 мин на льду, затем их аккуратно отмывали раствором, содержащим 1% BSA. В этот же раствор вносили первичные антитела против фактора Виллебранда (Rabbit anti-human vWF, «Dako», Франция, разведение 1/500 (исходная концентрация антител 3,2 мг/мл)) и инкубировали ночь при 4 °C. После инкубации клетки отмывали и вносили смесь из вторичных антител (goat anti-rabbit AlexaFluor 488 («Invitrogen», США), разведение 1/1000), флуоресцентно-меченного лектина WGA (weat germ agglutinin AlexaFluor 488 («Invitrogen», США), разведение 1/500) и ядерного красителя Hoechst 33258 («Sigma Aldrich», США) в концентрации 1 мкг/мл и далее инкубировали 1,5 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации клетки отмывали раствором PBS, содержащим 1% BSA, и помещали в насыщенный раствор фруктозы. Готовые препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 («Leica», Германия). Параметры захвата изображения настраивались по самому яркому образцу и не менялись в течение всего эксперимента. С центрального участка каждой лунки снимался мозаич-

ный кадр величиной в 25 микроскопических полей и имеющий физические размеры 1,5 × 2 мм. Съемка велась с использованием высокоскоростного адаптивного автофокуса. С каждого образца получали 25 изображений (по 16 кадров в изображении), содержащих 3 флуоресцентных канала с кодировкой глубины цвета 8 бит. С помощью программы CellProfiler определяли интенсивность флуоресценции окрашенного ФВ на каждом кадре в ЭК в контроле и после активации их H_2O_2 или тромбином.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, *а* показаны эндотелиальные клетки, окрашенные ARC1779-Cy5 (50 нМ). Перед добавлением аптамера клетки инкубировали в течение 20 мин с индуктором секреции ФВ – гистамином. Для выявления клеточных ядер использовали Hoechst 33342. ARC1779-Cy5 окрашивает небольшие структуры, имеющие в основном округлую или неправильную форму. Для оценки специфичности окрашивания ФВ аптамером ARC1779-Cy5 в качестве отрицательного контроля был использован конъюгированный с Cy5 олигонуклеотид такой же длины и с таким же соотношением нуклеотидов как у ARC1779, но со случайной нуклеотидной последовательностью (рис. 1, *б*). Контрольный олигонуклеотид практически не связывается с живыми клетками. Одиночные крупные яркие пятна, которые видны на рис. 1, *б*, представляют собой окрашенные безъядерные фрагменты мертвых клеток.

Зависимость связывания ARC1779-Cy5 с клетками от концентрации аптамера показана на рис. 2. ЭК инкубировали с ARC1779-Cy5 в концентрациях от 3,1 нМ до 1 мкМ. С помощью программы CellProfiler рассчитывали суммарную яркость окрашенных структур ФВ (objects) на поверхности клеток. Видно, что окрашивание аптамером ARC1779-Cy5 ФВ на мембране ЭК становится заметным, начиная с концентрации 50 нМ (рис. 2, *а*, кривая *1*). Яркость окрашивания возрастает при повышении концентрации ARC1779-Cy5 до 1 мкМ. Неспецифическое связывание метки определяли при соответствующих концентрациях конъюгата контрольного олигонуклеотида с Cy5. Конъюгированный с меткой контрольный олигонуклеотид почти не окрашивает клетки при концентрациях до 100 нМ. При дальнейшем повышении его концентрации интенсивность флуоресценции начинает возрастать из-за увеличения неспецифического связывания (рис. 2, *а*, кривая *2*). Изображенная на рис. 2, *а* кривая *3* представляет собой разность между интенсивностями флуоресценции ARC1779-Cy5 и контрольного олигонуклеотида и отражает специфическое взаимодействие ARC1779-Cy5 с ФВ. EC_{50} для связывания ARC1779-Cy5 с ФВ составило 287 нМ (95%-ный доверительный интервал 155–589 нМ). В экспериментах мы использовали концентрацию ARC1779-Cy5 50 нМ, при которой неспецифическое связывание метки невелико. Относительные значения яркости флуоресценции не активированных и активированных гистамином клеток после окраски их аптамером ARC1779-Cy5 или контрольным олигонуклеотидом в концентрации 50 нМ показаны на рис. 2, *б*. Видно, что гистамин не влияет на неспецифическое связывание флуоресцентной метки с ЭК. В отсутствии гистамина флуоресценция лишь незначительно превышает фоновое значение, что говорит о низком уровне экспрессии ФВ на

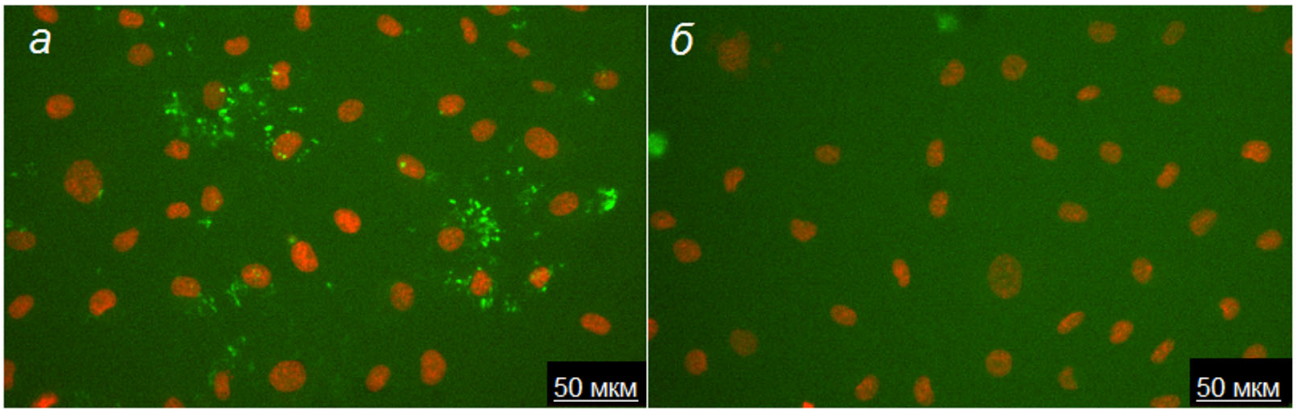

Рис. 1. Окрашивание аптамером ARC1779-Cy5 (*а*) и конъюгированным с флуоресцентной меткой Cy5 контрольным олигонуклеотидом (*б*) эндотелиальных клеток, активированных гистамином (100 мкМ). Концентрации ARC1779-Cy5 и контрольного олигонуклеотида – 50 нМ. (С цветными вариантами рис. 1–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

плазматической мембране ЭК в отсутствии активаторов.

Второй задачей работы было изучение регуляции экзоцитоза ФВ с помощью вышеописанного экспериментального подхода. Экзоцитоз ФВ в ЭК стимулируют нейроэндокринные факторы, включая тромбин [27], вазопрессин [28], гистамин [29], серотонин [30], адреналин [31], пуриновые нуклеотиды [32], цитокины и факторы роста [33, 34]. В реализации их действия участвуют вторичные посредники – cAMP и Ca^{2+} [35]. Известно, что пероксид водорода также выполняет в ЭК функцию вторичного мессенджера [36]. Кроме того, на функционирование ЭК оказывает влияние экзогенный H_2O_2, образующийся в нейтрофилах. Ранее нами было показано, что добавленный извне H_2O_2 проникает в эндотелиальные клетки [26]. Известным механизмом действия H_2O_2 как вторичного мессенджера является ингибирование тирозиновых протеинфосфатаз [37]. В ЭК H_2O_2 избирательно усиливает действие агонистов 5-HT1B- и 5-HT2B-рецепторов [38] и стимулирует двупоровые эндолизосомальные кальциевые каналы [39]. Данные о влиянии H_2O_2 на секрецию ФВ весьма противоречивы. Ранее было показано, что экзогенный супероксид-анион увеличивает секрецию ФВ во внешнюю среду культивируемыми ЭК, однако достоверного эффекта H_2O_2, добавленного в концентрациях вплоть до 0,5 мМ, выявлено не было [40]. Напротив, в работе Yang et al. [41] приведены данные об увеличении секреции ФВ в 1,5–2 раза под влиянием 0,5 мМ H_2O_2. В любом случае в этих исследованиях было установлено действие цитотоксической концентрации H_2O_2. Ранее методами иммуноцитофлуориметрии и иммуноферментного анализа нами было показано, что пероксид водорода в концентрации 100 мкМ (что ниже порога цитотоксичности для культивируемых ЭК из пупочной вены) вызывает увеличение количества экспонированного на поверхности ЭК ФВ и его секрецию во внеклеточную среду [26]. В данной работе мы продолжили эти исследования, применив новый подход с использованием аптамера ARC1779, к молекуле которого присоединен флуоресцентный краситель Cy5. В отличие от иммунофлуоресцентной метки, в случае конъюгата ARC1779-Cy5 окрашивание ЭК проводилось на живых клетках. Видно, что после воздействия 100 мкМ H_2O_2 в течение 20 мин количество окрашенных ARC1779-Cy5 клеток резко возросло (рис. 3, *б*) по сравнению с контролем (рис. 3, *а*). Средняя интенсивность флуоресценции (рис. 4, *а*) выросла в 4,47 раза ($p < 0,01$). Среднее число окрашенных точечных структур

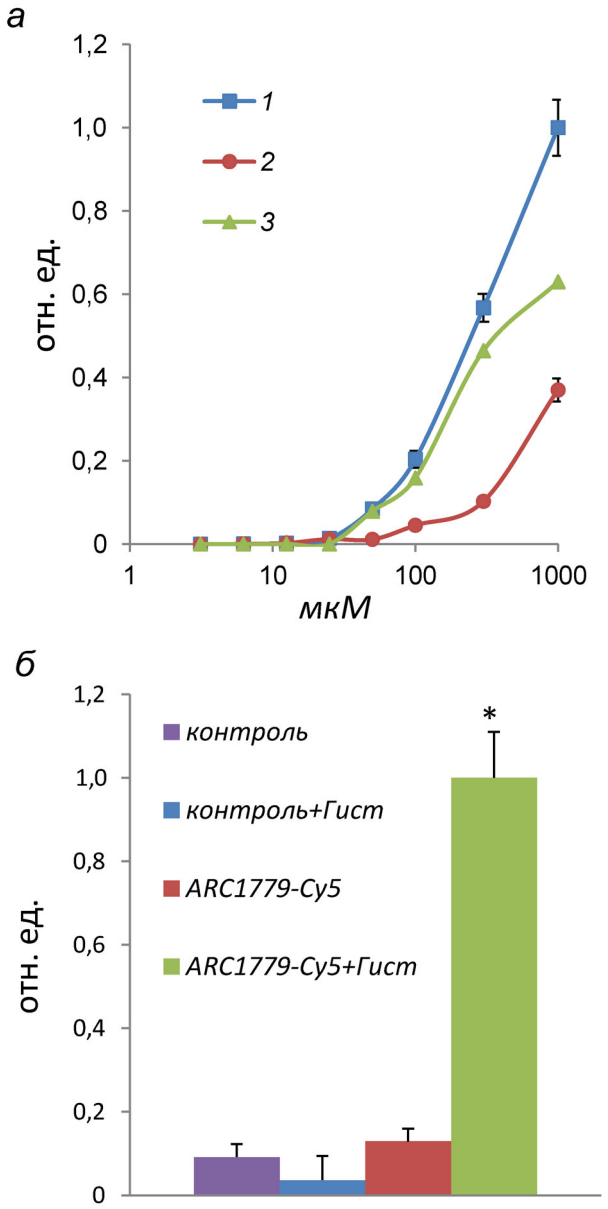

Рис. 2. *а* – Зависимости яркости флуоресценции ЭК от концентрации ARC1779-Cy5 (кривая *1*) или конъюгата контрольного олигонуклеотида с Cy5 (кривая *2*). Кривая *3* представляет собой разность между значениями на кривой *1* (общее связывание) и кривой *2* (неспецифическое связывание) и отражает взаимодействие ARC1779-Cy5 с ФВ. *б* – Яркость флуоресценции ЭК, окрашенных ARC1779-Cy5 (ARC1779-Cy5, ARC1779-Cy5 + Гист.) или контрольным олигонуклеотидом (контроль, контроль + Гист.) в концентрациях 50 нМ в отсутствии или в присутствии 100 мкМ гистамина (Гист.). *$p < 0,01$ – Достоверность отличия ARC1779-Cy5 + Гист. от ARC1779-Cy5 и от контролей

ФВ в пересчете на одну клетку при действии H_2O_2 составило 5,79, что в 4,3 раза превышает число структур ФВ в контроле (рис. 4, *б*). Степень прироста ФВ-позитивных структур практически совпадает с показателем увеличения

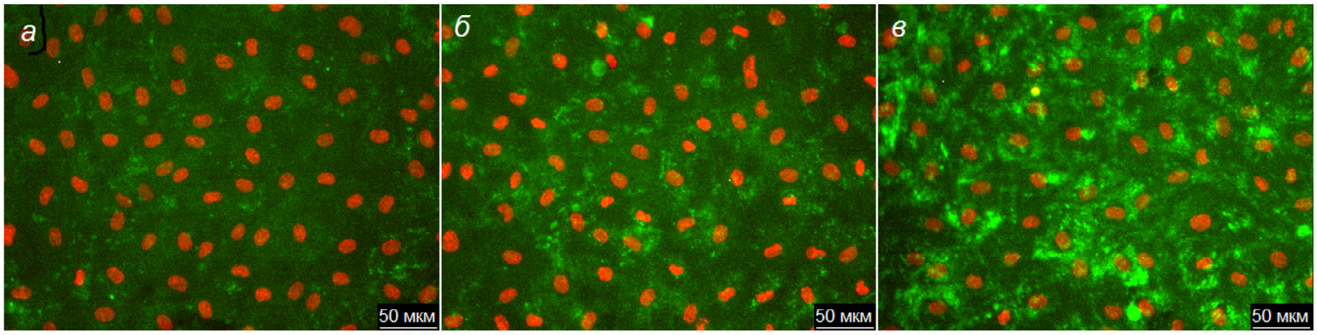

Рис. 3. Влияние H_2O_2 и тромбина на экзоцитоз ФВ в ЭК. Показаны ядра клеток и окрашенный с помощью ARC1779-Cy5 ФВ в ЭК в контроле (*а*), после воздействия 100 мкМ H_2O_2 (*б*) или 1 ед./мл тромбина (*в*). Концентрация ARC1779-Cy5 – 50 нМ

флуоресценции под влиянием H_2O_2. Из этого следует, что увеличение экспонирования ФВ на поверхности ЭК под действием H_2O_2 происходит главным образом в результате увеличения количества раскрытых секреторных везикул – телец Вейбеля–Паладе. Ранее в работах исследователей из Нидерландов [19, 42] с помощью корреляционного иммунофлуоресцентного и электронно-микроскопического анализа изображения было продемонстрировано, что во время секреции ФВ происходит слияние телец Вейбеля–Паладе с образованием более крупных секреторных капсул, которые раскрываются на плазматической мембране с образованием пор диаметром 0,5–5 мкм. Размеры выявляемых нами точечных структур ФВ лежат в рамках этого диапазона. Их средние максимальный и минимальный диаметры Ферета составляют в контроле 0,97 и 0,45 мкм соответственно, а с H_2O_2 – 1,02 и 0,48 мкм соответственно.

При определении эффекта H_2O_2 методом иммуноцитофлуориметрии мы регистрировали не более чем 2× увеличение количества ФВ, экспонированного на поверхности клеток [26]. Причиной более выраженного эффекта в случае использования ARC1779-Cy5, как мы предполагаем, является исключение стадии фиксации, при которой возможно дополнительное артефактное слияние секреторных пузырьков с мембраной. При сравнении данных, приведённых на рис. 2, *б* и 4, *а*, видно, что эффект H_2O_2 на экспрессию ФВ сопоставим с эффектом 100 мкМ гистамина. В качестве положительного контроля мы использовали также тромбин. Тромбин оказывает гораздо более мощный эффект – экспрессия ФВ на плазматической мембране ЭК возрастает в 31,2 раза, а число экспонированных структур ФВ в пересчете на количество ядер (т.е. на отдельную клетку) увеличивается в 36,5 раз. Близость этих значений указывает, что, как и в случае с H_2O_2, тромбин повышает экспрессию ФВ за счёт увеличения количества раскрытых секреторных везикул. Помимо точечных структур можно видеть одиночные окрашенные нити длиной в десятки микрон, которые образуются при слиянии в виде спирали сверхкрупных мультимеров ФВ (рис. 3, *в*).

Иммуноцитофлуоресцентный метод является стандартным подходом для определения экспрессии ФВ на поверхности ЭК. В данном исследовании для окрашивания ФВ вместо антитела был использован конъюгированный с флуоресцентной меткой Cy5 аптамер ARC1779. Принципиальным отличием предложенного подхода от иммунофлуоресцентного метода является окрашивание живых, а не фиксированных клеток. Мы провели сравнение данного метода с иммунофлуоресцентным. На рис. 5 показаны ЭК, окрашенные антителами против ФВ, в контроле и после воздействия H_2O_2 или тромбина. Был использован тот же препарат ЭК, как и в опыте с ARC1779-Cy5 (рис. 3), и такие же условия инкубации. Конечная концентрация первичных антител против ФВ составляла 40 нМ (разведение 1/500 исходного препарата IgG с концентрацией 3,2 мг/мл или 20 мкМ). Полученные изображения (рис. 5, *а–в*) соответствуют тем, которые были получены с помощью ARC1779-Cy5 (рис. 3). Четкость изображения при использовании антител выше, т.к. вторичные антитела дают более яркое окрашивание относительно фоновой флуоресценции, чем ARC1779-Cy5. Однако флуоресценция окрашенного ФВ при этом возрастала под действием H_2O_2 в 2 раза и тромбина – в 4 раза по отношению к контролю (рис. 5, *в*), в отличие от 4,5× и 31× увеличения в эксперименте с использованием ARC1779-Cy5 (рис. 4, *а*). В случае гистамина в опытах с окраской клеток антителами был более слабый эффект, чем при окраске ФВ аптамерами (данные не приводятся). Как уже отмечено

выше, мы предполагаем, что менее выраженный эффект агонистов на экспрессию ФВ на поверхности ЭК при иммунофлуоресцентном окрашивании объясняется тем, что во время фиксации происходит дополнительный артефактный экзоцитоз секреторных гранул. Таким образом, применение ARC1779-Cy5 позволяет исследовать более приближенные к реальности процессы регуляции экзоцитоза ФВ по сравнению с антителами, несмотря на то что получаемое с ARC1779-Cy5 изображение по контрастности уступает иммунофлуоресцентному окрашиванию.

Мы предполагаем, что можно увеличить отношение специфического окрашивания ФВ к фоновому окрашиванию, если использовать аптамеры, которые были разработаны уже после ARC1779 и проходят сейчас клинические испытания, как возможные препараты для лечения тромботической микроангиопатии. Есть данные, что аптамер TAGX-0004, в нуклеотидной последовательности которого имеется одно искусственное основание, более эффективно подавляет агрегацию тромбоцитов по сравнению с ARC1779 [17]. Пегилированный аптамер BT200 подавляет активность ФВ в плазме с IC_{50} 70 нМ [43]. Данные об эффективности этих двух аптамеров получены в тесте агрегации тромбоцитов. Тромбоциты также секретируют ФВ и связывают его на своей поверхности, поэтому конъюгат ARC1779-Cy5 может быть использован для оценки их активации методом проточной цитофлуориметрии.

С помощью ARC1779-Cy5 нам удалось выявить хорошо выраженную активацию экзоцитоза ФВ под действием H_2O_2. В условиях *in vivo* пероксид водорода образуется эндогенно в ЭК [36], а также выделяется нейтрофилами, адгезированными на поверхности активированного эндотелия [44]. Согласно расчетам, приведенным в работе Jones [45], скорость образования H_2O_2 в организме может достигать величины 500 мкмоль/кг/мин. В результате измерений концентрации H_2O_2 в стационарных условиях в цельной крови и в плазме крови человека и крысы, проведённых в разных лабораториях, получены данные в широком диапазоне концентраций – от единиц до десятков микромолей на литр плазмы и до сотен микромолей на литр крови [46, 47], последнее – за счет высокой концентрации H_2O_2 в эритроцитах и особенно в нейтрофилах, даже с учетом разницы в количестве этих клеток. Локальная концентрация H_2O_2 вблизи эндотелия может быть значительно выше средней концентрации в плазме крови. На препарате культивируемых ЭК из пупочной вены показано, что воздействие H_2O_2 в концентрации до 150 мкМ не оказывает на них заметного токсического действия [48, 49]. Таким образом, используемая в настоящих экспериментах концентрация 100 мкМ не является токсичной для ЭК в культуре и соответствует физиологическим условиям. Ранее показано, что в концентрациях 50–100 мкМ H_2O_2 вызывает в ЭК поверхностную экспрессию главного комплекса

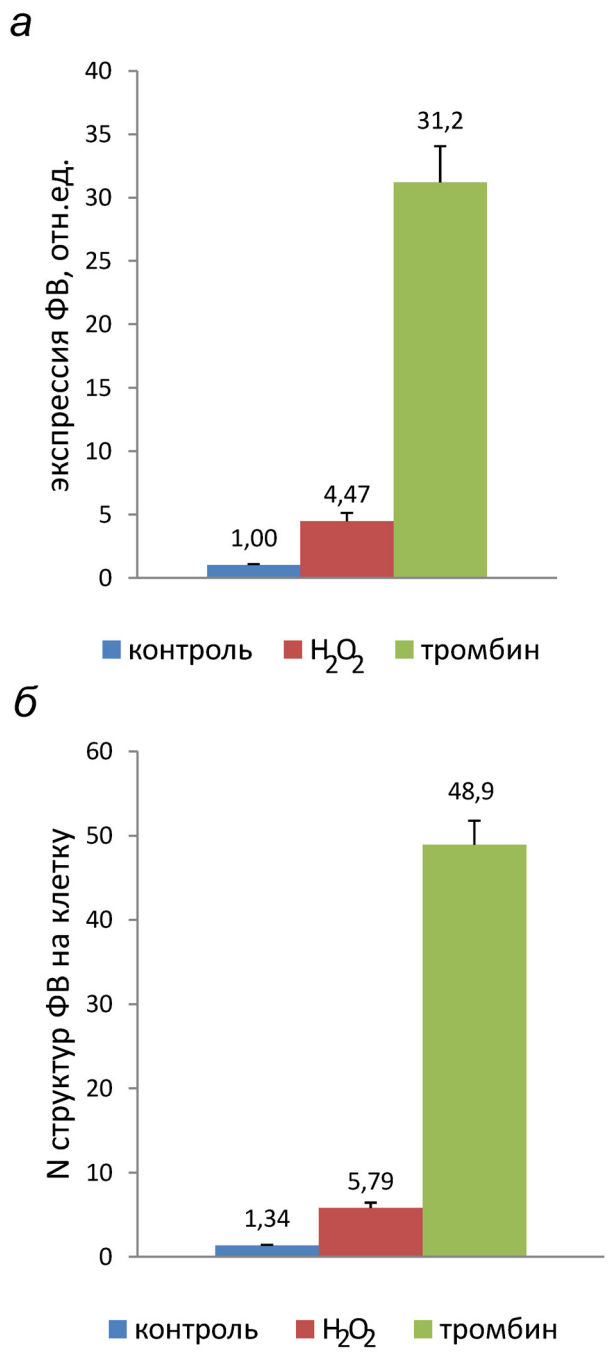

Рис. 4. Определение с помощью ARC1779-Cy5 экспрессии ФВ на поверхности ЭК (*а*) и среднего количества точечных структур ФВ в отдельной клетке (*б*) в контроле при воздействии 100 мкМ H_2O_2 или 1 ед./мл тромбина

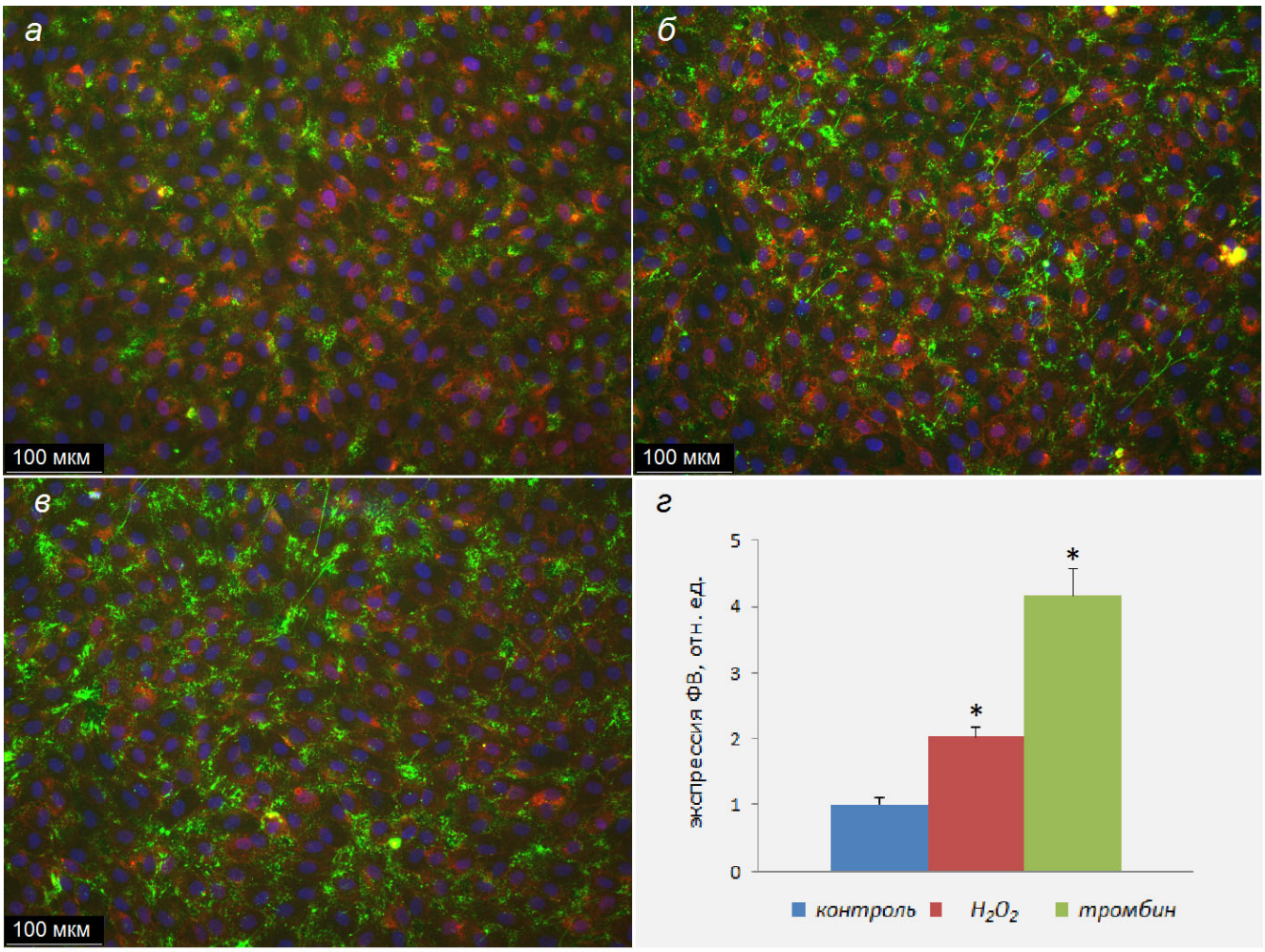

Рис. 5. Окрашивание с помощью антител ФВ на поверхности ЭК в контроле (*а*), при воздействии 100 мкМ H_2O_2 (*б*) или 1 ед./мл тромбина (*в*). Уровень экспрессии ФВ на поверхности ЭК, определенный иммунофлуоресцентным методом, в контроле и при активации ЭК H_2O_2 или тромбином (*г*). Достоверность отличия от контроля, $*p < 0{,}01$. Для выявления границ клеток проводилась окраска лектином WGA AlexaFluor 594. Окраска в псевдоцветах – ФВ представлен зеленым, ядра – синим, лектин – пурпурным цветом

гистосовместимости, MHC1, и молекулы межклеточной адгезии, ICAM-1 [50]. Приведенные данные дополняют представления о влиянии H_2O_2 на процессы секреции в ЭК.

Полученные результаты укладываются в рамки концепции о роли H_2O_2 как вторичного мессенджера, регулирующего, в дополнение к cAMP и Ca^{2+}, экзоцитоз ФВ в ЭК. В связи с этим встаёт вопрос: в действии каких нейроэндокринных факторов на данный процесс в ЭК принимает участие H_2O_2. Прямые данные, указывающие на участие H_2O_2 в рецептор-зависимой регуляции экзоцитоза ФВ, в литературе отсутствуют, однако есть косвенные свидетельства в пользу этой гипотезы. Известно, что рецепторы фактора роста VEGF взаимодействуют с NADPH-оксидазой NOX4, и через эти же рецепторы (VEGFR2) происходит активация секреции ФВ [51]. Провоспалительные цитокины IL-6, IL-9, TNFalpha также инициируют два процесса – экзоцитоз ФВ [34] и образование активных форм кислорода, включая H_2O_2 [52]. Однако во всех этих случаях возможная связь между стимуляцией секреции ФВ и образованием H_2O_2 не исследовалась. Недавно нами было показано, что блокатор NADPH-оксидаз, VAS2870, подавляет секрецию ФВ, вызванную гистамином [53]. Таким образом, для ответа на вопрос о роли H_2O_2 в передаче сигналов агонистов на обмен ФВ требуются дальнейшие исследования. Разработанный подход прижизненного окрашивания ФВ, экспонированного на поверхности ЭК, как нам представляется, будет способствовать прогрессу в этой области.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00417), а также в рамках госзадания № 0088-2021-0008 с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langmead, C. J., and Summers, R. J. (2018) Molecular pharmacology of GPCRs, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 4005-4008, doi: 10.1111/bph.14474.
2. Sriram, K., and Insel, P. A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.*, **93**, 251-258, doi: 10.1124/mol.117.111062.
3. Deyev, S. M., and Lebedenko, E. N. (2015) Supramolecular agents for theranostics, *Russ. J. Bioorg. Khim.*, **41**, 481-493, doi: 10.1134/s1068162015050052.
4. Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818-822, doi: 10.1038/346818a0.
5. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510, doi: 10.1126/science.2200121.
6. Wang, J., and Li, G. (2011) Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 4107-4116, doi: 10.2174/092986711797189628.
7. Spiridonova, V. A., Novikova, T. M., Sizov, V. A., Shashkovskaya, V. S., Titaeva, E. V., Dobrovolsky, A. B., Zharikova, E. B., and Mazurov, A. V. (2019) DNA aptamers to thrombin exosite I. Structure-function relationships and antithrombotic effects, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1521-1528, doi: 10.1134/S0006297919120113.
8. Rahimizadeh, K., Al Shamaileh, H., Fratini, M., Chakravarthy, M., Stephen, M., Shigdar, S., and Veedu, R. N. (2017) Development of cell-specific aptamers: recent advances and insight into the selection procedures, *Molecules*, **22**, 2070, doi: 10.3390/molecules22122070.
9. Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., et al. (2017) Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2142, doi: 10.3390/ijms18102142.
10. Zhang, Y., Lai, B. S., and Juhas, M. (2019) Recent advances in aptamer discovery and applications, *Molecules*, **24**, 941, doi: 10.3390/molecules24050941.
11. Bauer, M., Macdonald, J., Henri, J., Duan, W., and Shigdar, S. (2016) The application of aptamers for immunohistochemistry, *Nucleic Acid Ther.*, **26**, 120-126, doi: 10.1089/nat.2015.0569.
12. Zhang, P., Zhao, N., Zeng, Z., Feng, Y., Tung, C. H., Chang, C. C., and Zu, Y. (2009) Using an RNA aptamer probe for flow cytometry detection of CD30-expressing lymphoma cells, *Lab. Invest.*, **89**, 1423-1432, doi: 10.1038/labinvest.2009.113.
13. Sadler, J. E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 395-424, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395.
14. Duggan, S. (2018) Caplacizumab: first global approval, *Drugs*, **78**, 1639-1642, doi: 10.1007/s40265-018-0989-0.
15. Bae, O. N. (2012) Targeting von Willebrand factor as a novel anti-platelet therapy; application of ARC1779, an anti-vWF aptamer, against thrombotic risk, *Arch. Pharm. Res.*, **35**, 1693-1699, doi: 10.1007/s12272-012-1000-3.
16. Jilma-Stohlawetz, P., Knobl, P., Gilbert, J. C., and Jilma, B. (2012) The anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 increases von Willebrand factor levels and platelet counts in patients with type 2B von Willebrand disease, *Thromb. Haemost.*, **108**, 284-290, doi: 10.1160/TH11-12-0889.
17. Sakai, K., Someya, T., Harada, K., Yagi, H., Matsui, T., and Matsumoto, M. (2019) Novel aptamer to von Willebrand factor A1 domain (TAGX-0004) shows total inhibition of thrombus formation superior to ARC1779 and comparable to caplacizumab, *Haematologica*, **105**, 2631-2638, doi: 10.3324/haematol.2019.235549.
18. Matsunaga, K. I., Kimoto, M., and Hirao, I. (2017) High-Affinity DNA aptamer generation targeting von Willebrand factor A1-domain by genetic alphabet expansion for systematic evolution of ligands by exponential enrichment using two types of libraries composed of five different bases, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 324-334, doi: 10.1021/jacs.6b10767.
19. Valentijn, K. M., van Driel, L. F., Mourik, M. J., Hendriks, G. J., Arends, T. J., Koster, A. J., and Valentijn, J. A. (2010) Multigranular exocytosis of Weibel–Palade bodies in vascular endothelial cells, *Blood*, **116**, 1807-1816, doi: 10.1182/blood-2010-03-274209.
20. Kovacevic, K. D., Buchtele, N., Schoergenhofer, C., Derhaschnig, U., Gelbenegger, G., Brostjan, C., Zhu, S., Gilbert, J. C., and Jilma, B. (2020) The aptamer BT200 effectively inhibits von Willebrand factor (VWF) dependent platelet function after stimulated VWF release by desmopressin or endotoxin, *Sci. Rep.*, **10**, 11180, doi: 10.1038/s41598-020-68125-9.
21. Nimjee, S. M., Dornbos, D., 3rd, Pitoc, G. A., Wheeler, D. G., Layzer, J. M., et al. (2019) Preclinical development of a vWF aptamer to limit thrombosis and engender arterial recanalization of occluded vessels, *Mol. Ther.*, **27**, 1228-1241, doi: 10.1016/j.ymthe.2019.03.016.
22. Goncharov, N. V., Sakharov, I., Danilov, S. M., and Sakandelidze, O. G. (1987) Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man, *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **104**, 376-378.
23. Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P. R., and Forand, R. (1979) An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5674-5678, doi: 10.1073/pnas.76.11.5674.
24. Kudryavtsev, I. V., Garnyuk, V. V., Nadeev, A. D., and Goncharov, N. V. (2014) Hydrogen peroxide modulates expression of surface antigens by human umbilical vein endothelial cells *in vitro*, *Biochemistry (Moscow) Supp. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **8**, 97-102, doi: 10.1134/S1990747813050103.
25. Bray, M. A., Vokes, M. S., and Carpenter, A. E. (2015) Using CellProfiler for automatic identification and measurement of biological objects in images, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **109**, 1-18, doi: 10.1002/0471142727.mb1417s109.
26. Avdonin, P. V., Tsitrina, A. A., Mironova, G. Y., Avdonin, P. P., Zharkikh, I. L., Nadeev, A. D., and Goncharov, N. V. (2017) Hydrogen peroxide stimulates exocytosis of von

Willebrand factor in human umbilical vein endothelial cells, *Biol. Bull.*, **44**, 531-537, doi: 10.1134/s106235901705003x.
27. Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., and Sims, P. J. (1989) Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7768-7771.
28. Kaufmann, J. E., Oksche, A., Wollheim, C. B., Gunther, G., Rosenthal, W., and Vischer, U. M. (2000) Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP, *J. Clin. Invest.*, **106**, 107-116, doi: 10.1172/JCI9516.
29. Esposito, B., Gambara, G., Lewis, A. M., Palombi, F., D'Alessio, A., et al. (2011) NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells, *Blood*, **117**, 4968-4977, doi: 10.1182/blood-2010-02-266338.
30. Schluter, T., and Bohnensack, R. (1999) Serotonin-induced secretion of von Willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic AMP-signaling systems independent of increased cytoplasmic calcium concentration, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 1191-1197.
31. Vischer, U. M., and Wollheim, C. B. (1997) Epinephrine induces von Willebrand factor release from cultured endothelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent signalling in exocytosis, *Thromb. Haemost.*, **77**, 1182-1188.
32. Vischer, U. M., and Wollheim, C. B. (1998) Purine nucleotides induce regulated secretion of von Willebrand factor: involvement of cytosolic Ca^{2+} and cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling in endothelial exocytosis, *Blood*, **91**, 118-127.
33. Matsushita, K., Yamakuchi, M., Morrell, C. N., Ozaki, M., O'Rourke, B., Irani, K., and Lowenstein, C. J. (2005) Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel–Palade-body exocytosis, *Blood*, **105**, 207-214, doi: 10.1182/blood-2004-04-1519.
34. Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J. F., and Dong, J. F. (2004) Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow, *Blood*, **104**, 100-106, doi: 10.1182/blood-2004-01-0107.
35. Vischer, U. M. (2006) Von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease, *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 1186-1193, doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01949.x.
36. Breton-Romero, R., and Lamas, S. (2014) Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells, *Redox Biol.*, **2**, 529-534, doi: 10.1016/j.redox.2014.02.005.
37. Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S., and Woo, H. A. (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 183-189, doi: 10.1016/j.ceb.2005.02.004.
38. Avdonin, P. V., Nadeev, A. D., Mironova, G. Y., Zharkikh, I. L., Avdonin, P. P., and Goncharov, N. V. (2019) Enhancement by hydrogen peroxide of calcium signals in endothelial cells induced by 5-HT1B and 5-HT2B receptor agonists, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 1701478, doi: 10.1155/2019/1701478.
39. Avdonin, P. V., Nadeev, A. D., Tsitrin, E. B., Tsitrina, A. A., Avdonin, P. P., Mironova, G. Y., Zharkikh, I. L., and Goncharov, N. V. (2017) Involvement of two-pore channels in hydrogen peroxide-induced increase in the level of calcium ions in the cytoplasm of human umbilical vein endothelial cells, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **474**, 209-212, doi: 10.1134/S1607672917030152.
40. Vischer, U. M., Jornot, L., Wollheim, C. B., and Theler, J. M. (1995) Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells, *Blood*, **85**, 3164-3172.
41. Yang, S., Zheng, Y., and Hou, X. (2019) Lipoxin A4 restores oxidative stress-induced vascular endothelial cell injury and thrombosis-related factor expression by its receptor-mediated activation of Nrf2-HO-1 axis, *Cell. Signal.*, **60**, 146-153, doi: 10.1016/j.cellsig.2019.05.002.
42. Mourik, M. J., Valentijn, J. A., Voorberg, J., Koster, A. J., Valentijn, K. M., and Eikenboom, J. (2013) Von Willebrand factor remodeling during exocytosis from vascular endothelial cells, *J. Thromb. Haemost.*, **11**, 2009-2019, doi: 10.1111/jth.12401.
43. Zhu, S., Gilbert, J. C., Hatala, P., Harvey, W., Liang, Z., Gao, S., Kang, D., and Jilma, B. (2020) The development and characterization of a long acting anti-thrombotic von Willebrand factor (VWF) aptamer, *J. Thromb. Haemost.*, **18**, 1113-1123, doi: 10.1111/jth.14755.
44. Shappell, S. B., Toman, C., Anderson, D. C., Taylor, A. A., Entman, M. L., and Smith, C. W. (1990) Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils, *J. Immunol.*, **144**, 2702-2711.
45. Jones, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **295**, C849-C868, doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008.
46. Forman, H. J., Bernardo, A., and Davies, K. J. (2016) What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch. Biochem. Biophys.*, **603**, 48-53, doi: 10.1016/j.abb.2016.05.005.
47. Varma, S. D., and Devamanoharan, P. S. (1991) Hydrogen peroxide in human blood, *Free Radic. Res. Commun.*, **14**, 125-131, doi: 10.3109/10715769109094124.
48. Nadeev, A. D., Kudryavtsev, I. V., Serebriakova, M. K., Avdonin, P. V., Zinchenko, V. P., and Goncharov, N. V. (2016) Dual proapoptotic and pronecrotic effect of hydrogen peroxide on human umbilical vein endothelial cells, *Cell Tiss. Biol.*, **10**, 145-151, doi: 10.1134/S1990519X16020097.
49. Yang, D., Liu, X., Liu, M., Chi, H., Liu, J., and Han, H. (2015) Protective effects of quercetin and taraxasterol against H_2O_2-induced human umbilical vein endothelial cell injury *in vitro*, *Exp. Ther. Med.*, **10**, 1253-1260, doi: 10.3892/etm.2015.2713.
50. Bradley, J. R., Johnson, D. R., and Pober, J. S. (1993) Endothelial activation by hydrogen peroxide. Selective increases of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I, *Am. J. Pathol.*, **142**, 1598-1609.
51. Xiong, Y., Huo, Y., Chen, C., Zeng, H., Lu, X., et al. (2009) Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways, *J. Biol. Chem.*, **284**, 23217-23224, doi: 10.1074/jbc.M109.019679.
52. Mo, S. J., Son, E. W., Rhee, D. K., and Pyo, S. (2003) Modulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 expression, NO and H_2O_2 production by alginate, allicin and ascorbic acid in human endothelial cells, *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 244-251.
53. Avdonin, P. V., Rybakova, E. Y., Avdonin, P. P., Trufanov, S. K., Mironova, G. Y., Tsitrina, A. A., and Goncharov, N. V. (2019) VAS2870 Inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells, *Cells*, **8**, 196, doi: 10.3390/cells8020196.

THE USE OF FLUORESCENTLY LABELED ARC1779 APTAMER FOR ASSESSING THE EFFECT OF H_2O_2 ON VON WILLEBRAND FACTOR EXOCYTOSIS*

P. P. Avdonin[1], S. K. Trufanov[1], E. Yu. Rybakova[1], A. A. Tsitrina[1], N. V. Goncharov[2,3], and P. V. Avdonin[1]**

[1] *Koltsov Institute of Development Biology Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: pvavdonin@yandex.ru*

[2] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia*

[3] *Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, FMBA, 188663 Kuzmolovsky, Leningrad Region, Russia*

Here, we propose a new approach for quantitative estimation of von Willebrand factor (vWF) exposed on the surface of endothelial cells (ECs) using the ARC1779 aptamer that interacts with the vWF A1 domain. To visualize complex formation between vWF and the aptamer, the latter was conjugated with the Cy5 fluorescent label. Cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were stained with the ARC1779-Cy5 conjugate and imaged with a fluorescence microscope. The images were analyzed with the CellProfiler software. vWF released from the Weibel–Palade bodies was observed as bright dot-like structures of round and irregular shape, the number of which increased several times after HUVEC exposure to histamine or thrombin. Staining with ARC1779-Cy5 also revealed long filamentous vWF structures on the surface of activated HUVEC. vWF secretion by ECs is activated by the second messengers cAMP and Ca^{2+}. There is evidence that hydrogen peroxide also acts as a second messenger in ECs. In addition, exogenous H_2O_2 formed in leukocytes can enter ECs. The aim of our study was to determine the effect of H_2O_2 on the vWF exposure at the surface of HUVEC using the proposed method. It was shown that hydrogen peroxide at concentration 100 μM, which is lower than the cytotoxicity threshold of H_2O_2 for cultured HUVEC, increased several times the number of dot-like structures and total amount of vWF exposed on plasma membrane of HUVEC, which suggest that H_2O_2 acts as a mediator that activates exocytosis of Weibel–Palade bodies and vWF secretion in the vascular endothelium during inflammation and upon elevated generation of endogenous reactive oxygen species in ECs.

Keywords: von Willebrand factor, aptamers, hydrogen peroxide, endothelial cells, secretion