

Изменение содержания гликопротеинов на поверхностях клеточной культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 и интимы внутренних сонных артерий под влиянием магния оротата

Любовь Васильевна Диденко¹, Елена Арсеновна Улубиева^{2*},
Татьяна Геннадьевна Боровая¹, Александр Георгиевич Автандилов²,
Наталья Владимировна Шевлягина¹, Владимир Григорьевич Жуховицкий¹,
Олеся Михайловна Гринкевич¹, Марина Владимировна Мезенцева¹

¹ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи. Россия 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования
Россия 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/11

Цель. Изучить изменения содержания гликопротеинов в гликокаликсе эндотелиоцитов под влиянием магния оротата.

Материал и методы. Исследовали эндотелиоциты клеточной культуры EA.hy 926 до и после добавления в среду магния оротата. Кроме того, исследовали эндотелий интимы внутренних сонных артерий, фрагменты которых были получены при последовательно выполненной билатеральной резекции артерий до и после курса лечения магния оротатом. Для выявления гликопротеинов использован метод Энтони (1931), разработанный для исследования гликопротеинов в капсуле бактерий, и адаптированный для эукариот Л.В. Диденко (2013). Применен метод сканирующей электронной микроскопии с одновременным рентгеновским микроанализом.

Результаты. При картировании исследуемых образцов по химическому элементу «медь», как косвенному показателю содержания протеогликанов, в образцах клеточной культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 до инкубации с магния оротатом общее количество сигналов меди на одно поле сканирования составило 6928 ± 124 , а в образцах, полученных после инкубации с магния оротатом – 7592 ± 131 . На поверхности интимы внутренних сонных артерий количество сигналов ионов меди до лечения магния оротатом составило в среднем 5015 ± 407 , после лечения – 6100 ± 152 на одно поле сканирования.

Заключение. Выявлено достоверное увеличение содержания гликопротеинов на поверхности клеточной культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 (на 10%) и интимы внутренних сонных артерий (на 22%) под влиянием магния оротата.

Ключевые слова: электронная микроскопия, эндотелиоциты, гликопротеины, гликокаликс, сульфат меди, магния оротат.

Для цитирования: Диденко Л.В., Улубиева Е.А., Боровая Т.Г., Автандилов А.Г., Шевлягина Н.В., Жуховицкий В.Г., Гринкевич О.М., Мезенцева М.В. Изменение содержания гликопротеинов на поверхностях клеточной культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 и интимы внутренних сонных артерий под влиянием магния оротата. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2017;13(1):88-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.20996/1819-6446-2017-13-1-88-94>

Change in Content of Glycoproteins on the Surface of Endothelial Cell Culture EA.hy 926 and Intima of Internal Carotid Arteries under the Influence of Magnesium Orotate

Lyubov V. Didenko¹, Elena A. Ulubieva^{2*}, Tatiana G. Borovaya¹, Alexander G. Avtandilov², Natalia V. Shevlyagina¹, Vladimir G. Zhukhovitsky¹, Olesya M. Grinkevich¹, Marina V. Mezentseva¹

¹ N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology. Gamaleya ul. 18, Moscow, 123098 Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education. Barrikadnaya ul. 2/11, Moscow, 125993 Russia

Aim. To study changes in the glycoproteins content in the glycocalyx of endothelial cells under the influence of magnesium orotate.

Material and methods. Endotheliocytes of cell culture EA.hy 926 were examined before and after addition of the magnesium orotate to the culture medium. Intimal endothelium of internal carotid arteries, fragments of which were obtained by sequential execution of bilateral resection of the arteries before and after course of treatment with magnesium orotate was also investigated. Anthony' method (1931), designed for the study of glycoproteins in the bacteria capsule and adapted by L.V. Didenko (2013) for eukaryotes was used to detect glycoproteins. The scanning electron microscopy with simultaneous x-ray microanalysis was applied.

Results. Total number of Cu^{2+} -signals per one scanning field in the mapping of samples for Cu^{2+} as the indirect index of proteoglycan content in EA.hy 926 endothelial cell culture before incubation with magnesium orotate was 6928 ± 124 , and after incubation with magnesium orotate – 7592 ± 131 . Number of Cu^{2+} -signals on the surface of the internal carotid artery intima before treatment with magnesium orotate was 5015 ± 407 , and after treatment – 6100 ± 152 per one scanning field.

Conclusion. A significant increase in the content of glycoproteins on the surface of EA.hy926 endothelial cell culture (+10%) and internal carotid artery intima (+22%) under the influence of magnesium orotate was found.

Keywords: electron microscopy, endothelial cells, glycoproteins, glycocalyx, copper sulfate, magnesium orotate.

For citation: Didenko L.V., Ulubieva E.A., Borovaya T.G., Avtandilov A.G., Shevlyagina N.V., Zhukhovitsky V.G., Grinkevich O.M., Mezentsseva M.V. Change in Content of Glycoproteins on the Surface of Endothelial Cell Culture EA.hy 926 and Intima of Internal Carotid Arteries under the Influence of Magnesium Orotate. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2017;13(1):88-94 (In Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.20996/1819-6446-2017-13-1-88-94>

*Corresponding Author (Автор, ответственный за переписку): elena.ulubieva@yandex.ru

Received / Поступила: 01.12.2016

Accepted / Принята в печать: 21.12.2016

Известно, что эндотелиальная дисфункция (ЭД) является иницирующим фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Исследование механизмов ЭД показало, что одним из первых патогенетических механизмов возникновения болезней системы кровообращения (атеросклероза, гипертонической болезни, инсульта головного мозга) является повреждение эндотелиального гликокаликса (ЭГ) [1, 2]. Впервые на наличие гликокаликса на внутренней поверхности сосудистой стенки указали Danielli J.F. и соавт. в начале 40-х годов XX столетия, однако наблюдать гликокаликс как морфологическую единицу удалось лишь в 1966 г. (на поверхности эндотелия сосудов крысы), когда широкое применение получил метод трансмиссионной электронной микроскопии [3-5]. На основе теоретических моделей и экспериментальных исследований было показано, что гликокаликс эндотелиоцитов представляет собой совокупность протеогликанов, гликопротеинов, гликозаминогликанов и ассоциированных с ними белков плазмы с суммарным отрицательным зарядом [6,7]. Благодаря своему биохимическому составу и расположению на границе с циркулирующей кровью, гликокаликс эндотелия участвует в регуляции сосудистого гомеостаза, тонуса сосудов, поддержании интерстициального жидкостного равновесия, регуляции взаимодействия клеток крови и сигнальных соединений с сосудистой стенкой, сосудистой проницаемости, адгезии лейкоцитов и тромбоцитов, преобразовании напряжения сдвига и модуляции воспалительных процессов [8-10]. Полная или частичная потеря ЭГ приводит к нарушению функции эндотелия с последующим запуском цепочки патологических событий.

В многочисленных исследованиях последних десятилетий показано, что одним из наиболее существенных факторов, способствующих развитию патологии сосудов и сердца, является недостаток в организме магния [11,12]. Тем не менее, влияние магния на гистофизиологию эндотелия и его гликокаликса, как и значение магния в развитии ЭД, остаются мало изученными. Определенную помощь в решении этого вопроса может оказать исследование влияния магния оротата, как одного из наиболее часто применяемых в клинике маг-

ний-содержащих препаратов, на структурные компоненты гликокаликса эндотелия.

Целью исследования явилось изучение изменения содержания гликопротеинов в гликокаликсе эндотелиоцитов под влиянием магния оротата.

Материал и методы

Исследование проведено параллельно на перевиваемой клеточной культуре эндотелиоцитов EA.hy 926 (ATCC CRL-2922; условия *in vitro*) и эндотелии интимы внутренних сонных артерий (условия *in vivo*). В работе были использованы эндотелиальные клетки человека перевиваемой линии EA.hy926, которая была любезно предоставлена отделом иммунологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-западного отделения РАН (Санкт-Петербург; приобретена в Университете Северной Каролины, США). Культура получена путем гибридизации первичной эндотелиальной линии HUVEC с клетками карциномы легкого A-549 в 1983 г. Dr. Cora-Jean Edgell. Клетки линии EA.hy926 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам макрососудов человека [13]. Культура выращивалась на покровных стеклах, помещенных в питательную среду DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS; Биолот, Россия) по стандартной методике [14,15]. Пересев клеточной линии EA.hy926 осуществляли 1 раз в 3 дня по общепринятой методике в лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи», в эксперименте клетки использовали между 4-5 пассажами.

После получения монослоя эндотелиальных клеток часть покровных стекол с монослоем были отобраны как опытные образцы: в инкубационную среду с этими образцами добавляли по 30 мкл 0,33% раствора магния оротата и продолжали инкубацию в условиях CO₂ при температурном режиме 37°C в течение 1 сут. Концентрация раствора магния оротата рассчитывалась, исходя из максимальных суточных дозировок на килограмм веса, которые назначают пациентам в клинике. Другую часть покровных стекол с монослоем эндотелиоцитов (контрольные образцы) магния оротатом

не обрабатывали. После инкубации контрольные и опытные образцы фиксировали 10%-ным раствором формалина, отмывали стерильной водой и окрашивали 20%-ным водным раствором сульфата меди (исходное вещество $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, медь (II) сернокислая 5-водная. РЕАХИМ, Россия) в течение 1 мин для детекции гликопротеинов. Метод детекции гликопротеинов сульфатом меди был разработан Энтони (1931) для выявления гликопротеинов капсулы бактерий, и затем модифицирован в лаборатории Л.В.Диденко (ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи) в 2013 г. применительно к гликокаликсу эукариот [16-18]. Далее образцы отмывали стерильной водой, высушивали при комнатной температуре в течение 5 мин, крепили к алюминиевым столикам с помощью карбонового скотча, напыляли золотом (7 нм) 999 пробы и помещали в камеру двулучевого сканирующего ионно-электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, USA) с приставкой Genesis XM2 (EDAX, USA) для рентгеновского микроанализа (PMA).

Параллельно проводили аналогичный анализ интимы внутренних сонных артерий. Образцы сосудов получали в ходе последовательной билатеральной резекции внутренних сонных артерий (ВСА) у 5 пациентов с двусторонней патологической извитостью ВСА, выявленной впервые в ходе скринингового обследования для включения в группу по исследованию сосудов у практически здоровых женщин под влиянием факторов риска (возраста и курения).

Операции по реконструкции ВСА (резекция с редрессацией и реимплантацией артерии в старое устье) проводились в городской клинической больнице им. В.В. Вересаева Департамента здравоохранения города Москвы (ГКБ №81) в отделении сосудистой хирургии. Показаниями к хирургическому лечению явились: увеличение линейной скорости кровотока в зоне деформации до 220 см/с, регистрация турбулентного кровотока в просвете ВСА (согласно Национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями брахиоцефальных артерий, 2013) [19].

Операции проводились в два этапа: на первом этапе удаляли извитой участок ВСА с одной стороны; на втором (через 12 нед после первой операции) – с противоположной. Между первой и второй операциями (в течение 12 нед) пациентки получали магния оротат в суточной дозе 2,0 г (по 2 таблетки 2 р/д). Во время операций были получены фрагменты сосудов 1,5-2 см, включая атеросклеротические бляшки (АБ), обнаруженные на высоте извитости артерий во время цветового дуплексного сканирования у 2 пациенток (гемодинамически незначимые, занимающие около 20% просвета сосуда). Резекция сосудов проводилась в пределах визуально неизмененных (без атеросклеротических бляшек) участков ВСА, и морфологическому исследо-

ванию подвергались именно эти участки артерий, взятые до и после лечения магния оротатом.

Выбор такой тактики для исследования *in vivo* продиктован двумя причинами: невозможностью получения фрагментов сосудов у здоровых пациентов и показаниями к оперативному лечению больных с двусторонней патологической извитостью ВСА. Включение пациентов в исследование проводилось после подписания добровольного информированного согласия. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом.

Полученные фрагменты артерий фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина в течение 1 суток, обрабатывали 20%-ным раствором сульфата меди в течение 1 мин, отмывали от красителя стерильной водой 3 раза по 1 мин [17]. Окрашенные образцы фрагментов артерий просушивали в течение 5 мин при комнатной температуре и крепили интимой вверх к алюминиевым столикам с помощью карбонового клея (SPI Supplies, USA). Образцы напыляли золотом (проба 999), толщина слоя которого составила 7 нм. После обработки в напылительной установке SPI Sputter Coater (SPI Supplies, USA) образцы анализировали в двулучевом сканирующем ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, USA) с приставкой Genesis XM2 (EDAX, USA) для рентгеновского микроанализа в режиме высокого вакуума. Ниже приводятся спектрограммы данного микроанализа.

В обоих опытах (*in vitro* и *in vivo*) проводили картирование исследуемых образцов по химическому элементу «медь» для уточнения характера распределения ионов меди как косвенного детектора содержания гликопротеинов в составе гликокаликса. В опыте *in vitro* картирование проводили в условиях высокого вакуума, при увеличениях 2500х-7000х, в режимах полной и малой рамки, при ускоряющем напряжении 25 кВ, силе тока 2,4 нА, пятне 5,5, скорости счета 2500-5000. В опыте *in vivo* картирование проводили в условиях высокого вакуума, ускоряющем напряжении 25 кВ, при увеличении 2400х, пятне 6,5, скорости счета 5000-10000. В процессе PMA во всех образцах учитывали пики всех элементов (в том числе – неспецифические пики золота). Подсчет сигнала меди проводили с помощью программы Scandium, используемой при работе со сканирующим ионно-электронным микроскопом Quanta 200 3D.

Картирование заключалось в анализе распределения ионов меди на заданной площади поверхности образца (заданном «поле сканирования»). Площади сканирования составили: 347,5 кв. мкм при увеличении 7000; 2565,4 кв. мкм при увеличении 2500; 669,8 кв. мкм при увеличении 5000; 2803, 7 кв. мкм при увеличении 2400). В каждом образце было проанализировано по 10 полей.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) с представлением данных в виде средней величины и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Результаты и обсуждение

Рентгеновский микроанализ образцов клеточной культуры EA.hy 926 до и после инкубации с магния оротатом

Перед рентгеновским микроанализом (РМА) контрольных и опытных образцов клеточной культуры EA.hy 926 было исследовано содержание магния в инкубационных средах без добавления магния оротата (контрольная среда) и с его добавлением (опытная среда). РМА контрольной среды показал, что, помимо химических элементов (углерода, азота, кислорода, натрия, кремния, калия, серы, хлора), входящих в состав среды, весовое процентное содержание (Wt%) магния в ней составляет 0,03%. Зарегистрированный пик золота не является специфичным для данных образцов среды, т.к. золото привнесено в образец в процессе напыления. РМА опытной инкубационной среды показал

увеличение содержания магния до 0,14%, что приблизительно в 4,7 раза выше по сравнению с таковым в контрольной инкубационной среде. Таким образом, условия опыта *in vitro*, требовавшие инкубации образцов клеточной культуры EA.hy 926 при повышенной концентрации магния оротата, были выполнены. В образцах до инкубации с магния оротатом общее количество сигналов меди составило 6928 ± 124 на одно поле сканирования, а в образцах, полученных после инкубации с магния оротатом – 7592 ± 131 на одно поле сканирования (рис. 1, 2).

Таким образом, при картировании распределения ионов меди на поверхности клеточной культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 до и после инкубации с магния оротатом выявлено достоверное возрастание интенсивности сигнала на 10% ($p < 0,05$). Следует заметить, что как в контрольных, так и в опытных образцах присутствовали отдельные небольшие участки более интенсивного накопления ионов меди, что, вероятно, связано с разным количеством гликопротеинов на поверхностях клеток.

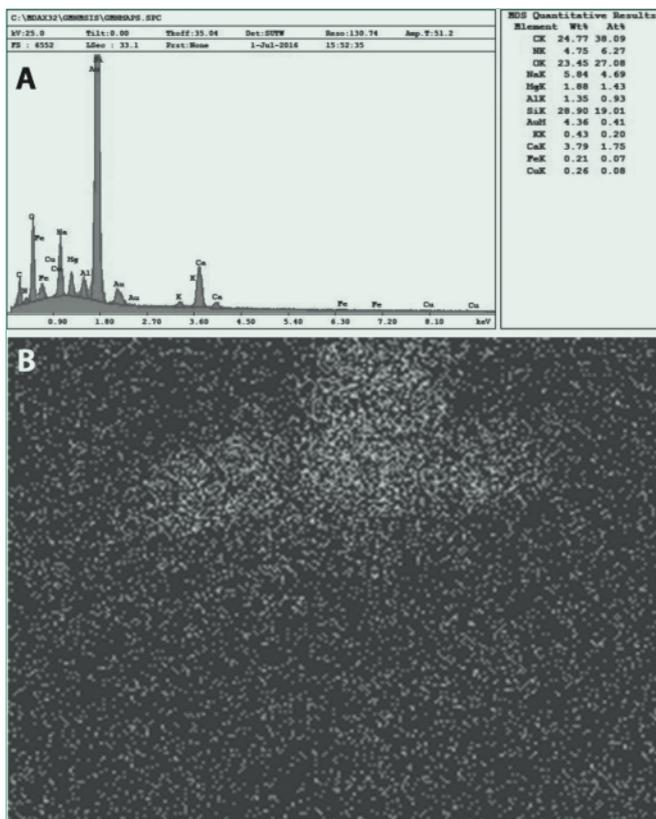


Figure 1. EAhy926 endothelial cell culture before incubation with a solution of magnesium orotate

A. X-ray spectrogram of culture; B. Mapping the Cu^{2+} distribution on the surface of EAhy 926 endothelial cells

Рисунок 1. Культура эндотелиоцитов EAhy 926 до инкубации с раствором магния оротата

A. Рентгеновская спектрограмма культуры; B. Картирование распределения меди на поверхности эндотелиоцитов EAhy 926

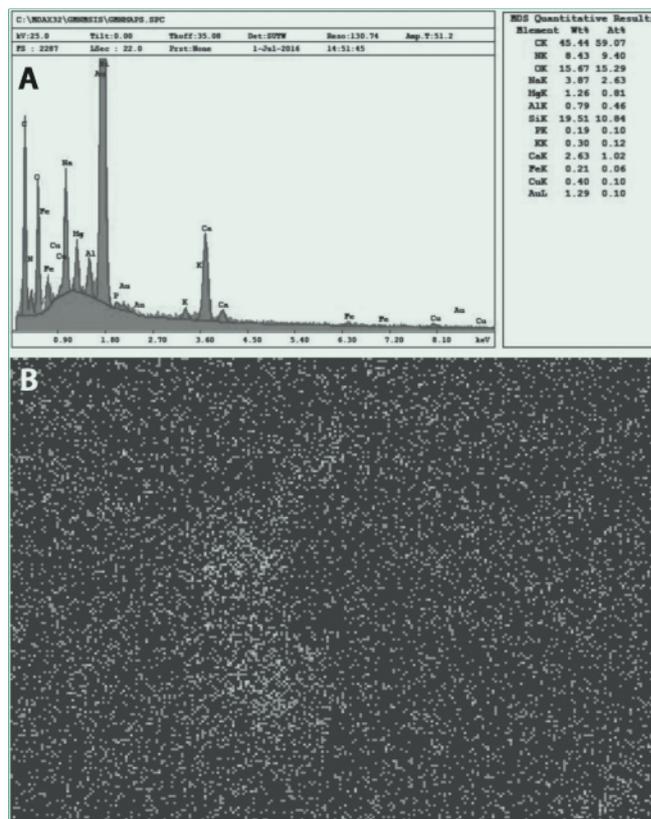


Figure 2. EAhy926 endothelial cell culture after incubation with a solution of magnesium orotate

A. X-ray spectrogram of culture; B. Mapping the Cu^{2+} distribution on the surface of EAhy 926 endothelial cells

Рисунок 2. Культура эндотелиоцитов EAhy 926 после инкубации с раствором магния оротата

A. Рентгеновская спектрограмма культуры; B. Картирование распределения меди на поверхности культуры эндотелиоцитов EAhy 926

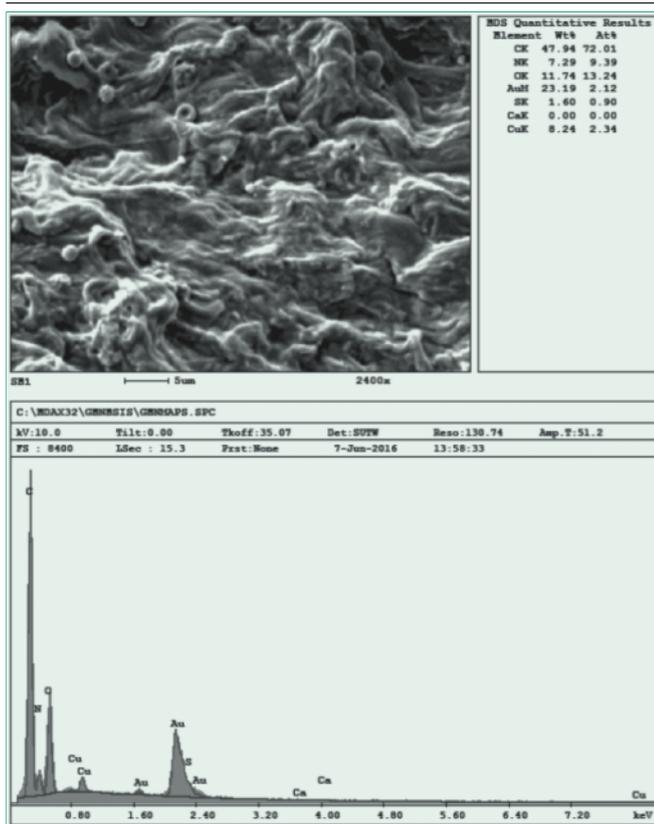


Figure 3. X-ray spectrogram of artery intima before magnesium orotate use

Рисунок 3. Рентгеновская спектрограмма интимы артерии до лечения магния оротатом

Рентгеновский микроанализ образцов интимы внутренних сонных артерий до и после лечения магния оротатом

При РМА образцов ВСА до и после лечения магния оротатом (рис. 3,4) на поверхности интимы были выявлены следующие химические элементы: углерод, азот, кислород, сера, кальций, медь и золото (золото, как указывалось выше, напылялось на поверхность образцов для создания слоя, проводящего электроны).

При картировании количество сигналов ионов меди на поле образца до лечения магния оротатом составило в среднем 5015 ± 407 , после лечения – 6100 ± 152 (рис. 5). Хотя в этой части опыта также была отмечена некоторая неравномерность распределения сигналов меди, однако суммарно интенсивность сигнала меди после лечения магния оротатом значительно возросла на 22% ($p < 0,05$).

Использованный в представленном исследовании метод РМА в дулучевом сканирующем ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, USA) с приставкой Genesis XM2 (EDAX, USA) характеризуется важным преимуществом перед другими методами исследования (в том числе – трансмиссионной электронной микроскопией), которые используются при анализе гликокаликса и его химических ингредиентов. Существенная особенность примененного нами метода за-

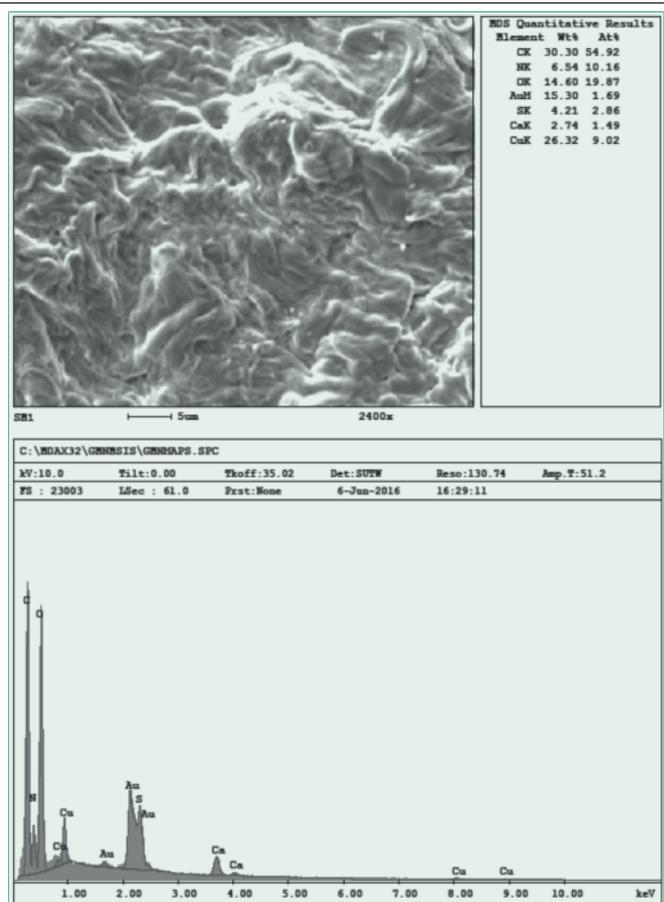


Figure 4. X-ray spectrogram of artery intima after magnesium orotate use

Рисунок 4. Рентгеновская спектрограмма интимы артерии после лечения магния оротатом

ключается в минимальном химическом воздействии на образцы при подготовке к исследованию, в первую очередь, по причине отсутствия этапа дегидратации, вызывающей выраженную деформацию (и в определенной степени – деструкцию) биоматериала, что приводит к искажению результатов. Из воздействий в процессе подготовки образцов была применена лишь химическая фиксация, что позволяет говорить о малой инвазивности метода пробоподготовки и, соответственно, о достаточной степени достоверности полученных фактов. В отечественной и зарубежной литературе мы не встретили каких-либо методических аналогов, которые позволяли бы детально обсуждать полученные нами результаты. Вместе с тем, общепризнанное участие катионов магния в подавляющем большинстве внутриклеточных биохимических реакций, благодаря их свойству формировать обратимые хелатные соединения с органическими молекулами, позволяет характеризовать катионы магния как высокоэффективные факторы клеточного метаболизма [20, 21]. Входящая в состав магния оротата оротовая кислота является химическим предшественником пиримидиновых оснований и, соответственно, служит ключевым

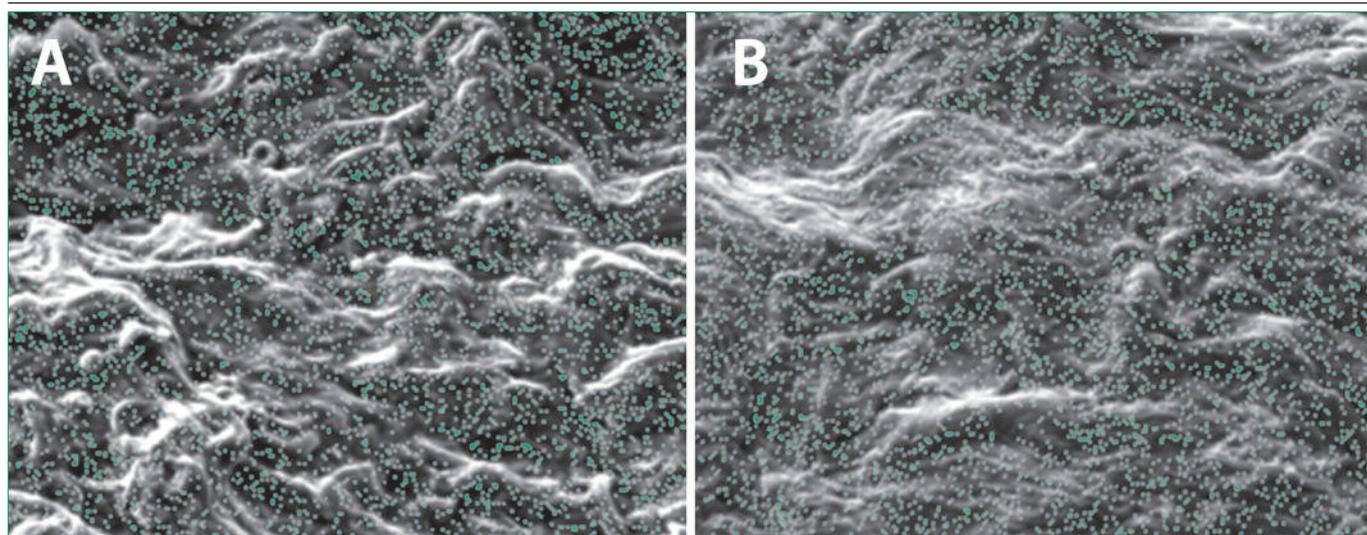


Figure 5. Mapping of Cu^{2+} -distribution (green signal) as a marker of proteoglycans on the surface of the internal carotid artery intima

A. Intimal surface before applying magnesium orotate; B. Surface intima internal carotid artery after using magnesium orotate

Рисунок 5. Картирование распределения меди (зеленый сигнал) как маркера протеогликанов на поверхности интимы внутренней сонной артерии

A. Поверхность интимы до применения магния оротата; B. Поверхность интимы внутренней сонной артерии после применения магния оротата

участником в биосинтезе нуклеиновых кислот и белковых соединений в клетке [22,23]. На этом основании можно предполагать, что обнаруженное увеличение содержания гликопротеинов на поверхности интимы внутренних сонных артерий пациентов, как и увеличение содержания гликопротеинов на поверхности культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 под влиянием магния оротата может быть не только результатом активации секреции гликопротеинов эндотелиоцитами, но и следствием увеличения интенсивности их синтеза. Отмеченное увеличение содержания гликопротеинов на поверхности эндотелия после лечения магния оротатом свидетельствует о восстановлении гликокаликса, что позволяет прогнозировать восстановление функции интимы и сосудистой стенки.

Ограничения исследования. Выявление и отбор пациентов с двусторонней извитостью ВСА, практически симметричной по форме с обеих сторон, отсутствием асимметрии диаметра внутренних сонных артерий заняло более года, несмотря на большое количество больных с заболеваниями брахиоцефальных артерий, поступающих в отделение сосудистой хирургии ГКБ им. В.В. Вересаева. С помощью тщательно проведенного ультразвукового дуплексного сканирования сосудов были отобраны пациенты с патологической извитостью ВСА с одинаковыми морфо-функциональными изменениями артерий с обеих сторон: минимальным отличием гемодинамических показателей внутрисосудистого кровотока, показателей периферического сопротивления, с одинаковой толщиной комплекса интима-медиа; из них 3 больных были с патологической извитостью ВСА без атеросклеротического поражения

сосудов, а 2 имели на высоте извитости с обеих сторон гемодинамически незначимые АБ, занимающие около 20% просвета сосуда. Тщательность отбора пациентов была продиктована необходимостью исключить влияние других факторов на возможные изменения состояния сосудистой стенки.

Заклучение

Проведенный рентгеновский микроанализ клеточной культуры эндотелиоцитов EA.hy 926 и интимы внутренних сонных артерий подтверждает, что воздействие магния оротата приводит к увеличению содержания гликопротеинов в составе гликокаликса эндотелия:

- на поверхности культуры эндотелиоцитов после инкубации с магния оротатом интенсивность сигнала меди (как детектора присутствия гликопротеинов) достоверно возрастает на 10% по сравнению с контрольными образцами (без инкубации с магния оротатом);
- на поверхности эндотелия интимы внутренних сонных артерий пациенток, получивших курс терапии магния оротатом, интенсивность сигнала меди достоверно увеличивается на 22% по сравнению с контрольными образцами (участками внутренних сонных артерий, полученными в ходе первого этапа операции, т.е. до лечения магния оротатом).

Зарегистрированное количественное увеличение интенсивности сигнала меди после воздействия магния оротата свидетельствует о положительном влиянии последнего на содержание гликопротеинов в гликокаликсе эндотелия. Это, предположительно, может быть

связано как с активацией секреции гликопротеинов, так и с повышением активности их синтеза эндотелиальными клетками.

Полученные результаты обосновывают применение магния оротата для коррекции эндотелиальной дисфункции и сосудистой патологии в целом.

References / Литература

1. Noble M.I., Drake-Holland A.J., Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *QJM*. 2008;101(7):513-8.
2. van den Berg B., Vink H. Glycocalyx perturbation: cause or consequence of damage to the vasculature? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(6):2174-5.
3. Danielli J.F. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol*. 1940;98(1):109-29.
4. Chambers R., Zweifach B.W. Intercellular Cement and Capillary Permeability. *Physiol Rev*. 1947;27:436-463.
5. Luft J.H. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc*. 1966;25:1773-83.
6. Weinbaum S., Tarbell J.M., Damiano E.R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:121-67.
7. Satchell S., Anderson K., Mathieson P. Angiopoietin 1 and vascular endothelial growth factor modulate human glomerular endothelial cell barrier properties. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:566-74.
8. Vink H., Duling B.R. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(1):285-289.
9. Firth J.A. Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. *J Anat*. 2002;200(6):541-8.
10. Maksimenko A.V., Turashev A.D. Visualization, composition and structure of endothelial glycocalyx. *Atherosclerosis and Dyslipidemia*. 2011;1:28-40. (In Russ.) [Максименко А.В., Турашев А.Д. Визуализация, состав и структура эндотелиального гликокаликса. *Атеросклероз и Дислипидемии*. 2011;1:28-40].
11. Gromova O.A., Torshin I.Y., Sardarian I.S. et al. Prospects for the use of drugs based on orotate magnesium in patients with cardiovascular disease. *Effektivnaya Farmakoterapiya*. 2013;33:53-62. (In Russ.) [Громова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С. и др. Перспективы применения препаратов на основе оротата магния у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Эффективная Фармакотерапия*. 2013;33:53-62].
12. Torshin I., Gromova O. Magnesium: fundamental studies and clinical practice. NY: Nova Biomedical Publishers; 2011.
13. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:3734-3737.
14. Edgell C.J., Curiel D.T., Hu P.C., Marr H.S. Efficient gene transfer to human endothelial cells using DNA complexed to adenovirus particles. *Biotechniques*. 1998;25:264-8.

About the Authors:

Lyubov V. Didenko – MD, PhD, Head of Laboratory, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Elena A. Ulubieva – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Therapy and Adolescent Medicine, Russian Medical Academy of Postgraduate Education
Tatiana G. Borovaya – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of Laboratory, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Alexander G. Avtandilov – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Therapy and Adolescent Medicine, Russian Medical Academy of Postgraduate Education
Natalia V. Shevlyagina – MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Vladimir G. Zhukhovitsky – MD, PhD, Head of Laboratory, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Olesya M. Grinkevich – Researcher of Laboratory of Tissue Culture, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Marina V. Mezentseva – PhD, Head of Laboratory of Tissue Culture, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Disclosures. All authors have not disclosed potential conflicts of interest regarding the content of this paper.

15. Bauer J., Margolis M., Schreiner C., et al. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression G-proteins and integrins. *J Cell Physiol*. 1982;153:437-49.
16. Anthony E.E. A note on capsule staining. *Science*. 1931;73:319-20.
17. Pirs E. *Histochemistry*. Moscow: Lan; 1962. Russian (Пирс Э. Гистохимия. М.: Лань; 1962).
18. Avtandilov A.G., Dzeranova K.M., Borovaya T.G., Didenko L.V. Effect of magnesium orotate to connective tissue framework and inotropic cardiac function in patients with mitral valve prolapse. *Clinico-morphological study. Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2013;9(4):390-7. (In Russ.) (Автандилов А.Г., Дзеранова К.М., Боровая Т.Г., Диденко Л.В. Влияние оротата магния на соединительнотканый каркас и инотропную функцию сердца у пациентов с пролапсом митрального клапана. *Клинико-морфологическое исследование. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2013;9(4):390-7).
19. National references on maintaining patients with diseases the brachiocephalic arteries. *Angiologiya i Sosudistaya Khirurgiya*. 2013;19(2) suppl:2-12. (In Russ.) [Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями брахиоцефальных артерий. *Ангиология и Сосудистая Хирургия*. 2013;19(2) приложение:2-12].
20. Torshin I.Y., Gromova O.A. Displaziya of connecting fabric, cell-like biology and molecular mechanisms of influence of a magnesium. *Russkiy Meditsinskiy Zhurnal*. 2008;(4):263-9. (In Russ.) [Торшин И.Ю., Громова О.А. Дисплазия соединительной ткани, клеточная биология и молекулярные механизмы воздействия магния. *Русский Медицинский Журнал*. 2008;(4):263-9].
21. Torshin I.Y., Gromova O.A., Fedotov L.E., et al. Hemoinformatsionny orotic acid molecule analysis indicates inflammatory, neuroprotective and cardioprotective properties of the ligand of magnesium. *Farmateka*. 2013;13:95-104. (In Russ.) [Торшин И.Ю., Громова О.А., Федотова Л.Э. и др. Хемоинформационный анализ молекулы оротовой кислоты указывает на противовоспалительные, нейропротекторные и кардиопротекторные свойства лиганда магния. *Фарматека*. 2013;13:95-104].
22. Mierch J., Crancharov K., Krause G.J. et al. Biological activity and mode of action of some dihydroorotic acid and derivatives. *Biomed Biochim Acta*. 1987;46(5):307-15.
23. Yarosh A.K. Magnesium and orotic acid - two of the most important components for regulating the functions of the nervous and muscular systems. *Mezhdunarodnyy Endokrinologicheskiy Zhurnal*. 2010;8(32):64-78. (In Russ.) [Ярош А.К. Магний и оротовая кислота - два из наиболее важных компонентов для регуляции функций нервной и мышечной систем организма. *Международный Эндокринологический Журнал*. 2010;8(32):64-78].

Сведения об авторах:

Диденко Любовь Васильевна – д.м.н., зав. лабораторией ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Улубиева Елена Арсеновна – к.м.н., доцент кафедры терапии и подростковой медицины РМАНПО
Боровая Татьяна Геннадьевна – д.м.н., член-корр. РАН, профессор, гл.н.с. лаборатории ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Автандилов Александр Георгиевич – д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии и подростковой медицины РМАНПО
Шевлягина Наталья Владимировна – к.м.н., с.н.с. лаборатории ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Жуховицкий Владимир Григорьевич – к.м.н., зав. лабораторией ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Гринкевич Олеся Михайловна – н.с. лаборатории культур тканей ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Мезенцева Марина Владимировна – д.б.н., руководитель лаборатории культур тканей ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи