

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ GRP78 И GRP94 В МИКРО- И МАКРОЦИРКУЛЯТОРНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Т. О. СУХАН¹⁾, А. С. НЕВМЕРЖИЦКАЯ²⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт биологии опухоли и экспериментальной терапии Георга Спайера, ул. П. Эрлиха, 42-44, 60596, г. Франкфурт-на-Майне, Германия

Изучена экспрессия шаперонов GRP78 и GRP94, активируемых в условиях стресса, в микро- и макроциркуляторных эндотелиальных клетках человека при гипоксии и в стандартных условиях культивирования. Эксперименты выполнены на эндотелиальных клетках из пуповинной вены человека (HUVEC), микроциркуляторных эндотелиальных клетках кожи человека (HDMEC) и микроциркуляторных эндотелиальных клетках плаценты человека (HMPEC). Экспрессия белков определена путем иммуноблоттинга, количественная оценка экспрессии произведена с помощью программы ImageJ. Установлено, что в стандартных условиях культивирования экспрессия белков GRP78 и GRP94 в HUVEC сравнима с таковой в HDMEC и отличается от профиля экспрессии в HMPEC. В условиях гипоксии выявлено изменение профиля экспрессии белков GRP78 и GRP94, которая в микроциркуляторных эндотелиальных клетках (HDMEC и HMPEC) отличается от экспрессии в макроциркуляторных эндотелиальных клетках (HUVEC).

Ключевые слова: эндотелиальные клетки; гипоксия; белки теплового шока.

EXPRESSION OF GRP78 AND GRP94 PROTEINS IN THE HUMAN MICRO- AND MACROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS UNDER HYPOXIA

T. O. SUHAN^a, A. S. NEVMERZHITSKAYA^b

^aBelarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

^bGeorge Spaiher Institute of the Tumor Biotechnology and Experimental Therapy, P. Erlich Street, 42-44, 60596, Frankfurt-am-Main, Germany

Corresponding author: T. O. Suhan (tanyasuhan@mail.ru)

It was investigated the expression of stress activated chaperons GRP78, GRP94 in human microvascular and macrovascular endothelial cells in normoxic and hypoxic conditions of cultivations. The experiments were carried out on HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) and HMPEC (human microvascular placental endothelial cells). The proteins expression was estimated with immunoblotting.

Образец цитирования:

Сухан Т. О., Невмержицкая А. С. Экспрессия белков GRP78 и GRP94 в микро- и макроциркуляторных эндотелиальных клетках человека в условиях гипоксии // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 17–24.

For citation:

Suhan T. O., Nevmerzhitskaya A. S. Expression of GRP78 and GRP94 proteins in the human micro- and macrovascular endothelial cells under hypoxia. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 17–24 (in Russ.).

Авторы:

Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Александра Сергеевна Невмержицкая – научный сотрудник.

Authors:

Tatyana Suhan, PhD (biology); senior researcher at the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Aleksandra Nevmerzhitskaya, research assistant.

nevmerzhitskaja@gmail.com

Densitometry of the immunoblotting results was done with «ImageJ» software. It was found out that in normoxic conditions pattern of GRP78 and GRP94 expression in HUVEC is similar to HDMEC and differs from HMPEC. Hypoxia changes expression of stress-induced proteins GRP78 and GRP94. Expression of GRP78 and GRP94 in microvascular endothelial cells (HDMEC, HMPEC) differs from expression in macrovascular endothelial cells (HUVEC).

Key words: endothelial cells; hypoxia; heat shock proteins.

Введение

Многие патологические состояния организма сопровождаются гипоксией, влиянию которой подвержены различные органы и ткани, в том числе эндотелий сосудов. Причиной этого может быть пониженный уровень кислорода в окружающей среде. Способность адаптироваться к острой и хронической гипоксии становится критичной для выживания. Многие беспозвоночные и низшие позвоночные выработали устойчивость к гипоксии [1–3], но большинство млекопитающих имеют ограниченные возможности адаптации к ней и, следовательно, гораздо чувствительнее в этом отношении. Между тем адаптивный потенциал к гипоксии среди клеток млекопитающих существенно отличается. Так, для эндотелиальных клеток, которые могут напрямую испытывать на себе воздействие пониженного содержания кислорода в крови, способность адаптироваться к гипоксии является жизненно важной. Доказано, что эндотелиальные клетки легочной вены, которые в организме регулярно подвергаются гипоксии, в условиях экспериментального понижения кислорода сохраняют жизнеспособность [4–9]. В то же время в аналогичных условиях другие типы клеток (кардиомиоциты, гепатоциты, эпителиальные клетки почечных канальцев, нейроны) крайне чувствительны к гипоксии [1–11]. Механизмы, посредством которых эндотелиальные клетки адаптируются к ней, изучены мало. Если рассматривать гипоксию как стрессовый фактор, логично оценить экспрессию стресс-индуцируемых белков, к которым относится семейство белков теплового шока (HSP). Установлено повышение их экспрессии при ответе на стресс [12].

В случае стрессового воздействия, в результате которого нарушается структура белка, на помощь приходят белки HSP, и в первую очередь семейства Hsp70. Они взаимодействуют с открывшимися гидрофобными поверхностями частично денатурированных белков, предотвращая их агрегацию и содействуя рефолдингу. Способность шаперонов, к которым также относятся белки семейства Hsp70, неспецифически связываться с гидрофобными пептидами позволяет им взаимодействовать с широким спектром субстратов. Белки семейства Hsp70 характеризуются высокой видовой структурной гомологией и функциональной консервативностью. Выполняя функцию защиты от стресса, они участвуют в таких важных клеточных процессах, как трансляция, перенос белков через мембрану, презентация белков с их последующей деградацией, агрегация и дезагрегация белков, апоптоз [13–16].

Еще один представитель семейства HSP – белок GRP94, который экспрессируется главным образом в эндоплазматическом ретикулеуме (ЭПР). Являясь молекулярным шапероном, GRP94 участвует в процессинге и транспорте секретируемых белков. Основные субстраты GRP94 имеют дисульфидные связи [17]. Кроме того, GRP94 – один из ключевых белков, связывающих ионы кальция [17]. Как правило, стрессовые факторы, вызывающие изменение уровня кальция, гликозилирования и кислотно-основное состояние в ЭПР, активируют молекулярный каскад, направленный на восстановление гомеостаза в клетке или на запуск ее апоптоза. GRP94 и другие шапероны – главные участники этого каскада.

Цель настоящего исследования – изучить *in vitro* уровень экспрессии белков теплового шока GRP78 и GRP94 в трех типах эндотелиальных клеток в условиях гипоксии.

Методы исследования

Клеточные культуры. Эксперименты выполнены на трех типах эндотелиальных клеток:

- HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, макроvasкулярные);
- HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells);
- HMPEC (human microvascular placental endothelial cells).

Клетки были выделены и фенотипированы в *Repair-Lab* Института патологии (медицинский центр Университета им. И. Гутенберга, г. Майнц, Германия). Культивирование проводили в среде, приготовленной на основе базовой среды для эндотелиальных клеток (*Promo Cell*, Германия), с добавлением 15 % телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 3 нг/мл bFGF и 0,02 % Na-Нер. Клетки контроля выращивали в 6-луночных планшетах в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂, 95 % воздуха). Для создания условий гипоксии клетки выращивали при пониженном содержании кислорода (37 °C, 5 % CO₂, ≤1 % O₂).

Моделирование гипоксии *in vitro*. Клетки выращивали в 6-луночных планшетах в течение суток в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5 % CO₂, 95 % воздуха), затем планшеты помещали в герметичные пакеты с поглотителем кислорода AnaeroGenTM Compact (*Hardy Diagnostics*, Англия), что обеспечивало поддержание O₂ ≤ 1 %. Снижение уровня кислорода контролировали с помощью анаэробного индикатора (*Thermo Scientific*, Англия), который в анаэробных условиях меняет цвет с красного на белый. Через 24, 48 и 72 ч планшеты извлекали из пакетов, удаляли из них среду, промывали буфером и проводили выделение белков.

Выделение белков. Лизис клеток выполняли с использованием RIPA-буфера посредством добавления ингибиторов протеаз. Белковый супернатант собирали после центрифугирования лизата (15 мин при 14 тыс. об/мин и 4 °C).

Концентрацию белков определяли с помощью коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific*) согласно инструкции. Калибровочную кривую строили, применяя бычий сывороточный альбумин.

Иммуноблоттинг. Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, в котором присутствовал додецилсульфат натрия, по Лэммли [18] и переносили их с геля на изготовленную из нитроцеллюлозы мембрану методом электроблоттинга. Неспецифические связывания блокировали добавлением раствора бычьего сывороточного альбумина. В работе использовали первичные поликлональные кроличьи антитела к белкам GRP78, GRP94, ERK1/2 (*Santa Cruze*, Германия) и вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве хемилюминесцентного субстрата применяли набор ECL (*Bio-Rad*, Германия).

Денситометрия. Чтобы получить количественные данные, результаты иммуноблоттинга обрабатывали с помощью программы ImageJ. Экспрессию целевого изучаемого белка нормировали по экспрессии контрольных белков (ERK1/2).

Статистическая обработка результатов

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного комплекса Microsoft XP. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Чтобы выявить достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами, использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспрессия GRP94 и GRP78 в контрольных эндотелиальных клетках. Показано, что при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂, 95 % воздуха) через 24 ч экспрессия GRP94 в HUVEC и HDMEC была сравнима, а в HMPEC – в 2,5 раза выше, чем в HUVEC ($p \leq 0,01$) и HDMEC ($p \leq 0,01$) (рис. 1, а). Через 48 ч инкубации экспрессия GRP94 снизилась во всех типах эндотелиальных клеток; через 72 ч экспрессия GRP94 в HUVEC ($p \leq 0,01$) и HDMEC ($p \leq 0,01$) значительно усилилась по сравнению с уровнем 24 ч, а в клетках HMPEC вернулась к уровню 24 ч (см. рис. 1, а).

В стандартных условиях культивирования (37 °C, 5 % CO₂, 95 % воздуха) через 24 ч по степени возрастания экспрессии GRP78 клетки располагались следующим образом: HUVEC, HDMEC, HMPEC (см. рис. 1, б). Уровень экспрессии GRP78 через 48 ч инкубации снизился, а через 72 ч возрос во всех типах клеток (см. рис. 1, б). При этом через 72 ч инкубации экспрессия GRP78 в клетках HUVEC и HDMEC была значительно выше, чем через 24 ч, а в клетках HMPEC оказалась выше, чем через 48 ч, но немного ниже, чем через 24 ч (см. рис. 1, б).

Таким образом, через 24 ч культивирования в стандартных условиях эндотелиоциты из микроциркуляторного русла плаценты (HMPEC) показали максимальный уровень экспрессии обоих шаперонов GRP78 и GRP94, что, возможно, связано с особой ролью плаценты. Появляется все больше данных о том, что плацента участвует в фетальном программировании [19]. Адекватное развитие плаценты и ее адаптивные возможности определяют нормальное развитие плода. Являясь посредником в транспорте питательных веществ и кислорода от матери к развивающемуся и растущему плоду, плацента должна обладать высоким адаптивным потенциалом, поскольку материнский организм не всегда находится в идеальном состоянии, подвергаясь гипоксии и метаболическим нарушениям. Если отклонения со стороны материнского организма превышают адаптивные возможности плаценты, то они могут запустить фетальное программирование у плода, которое приведет к аналогичным патологиям во взрослом организме.

Интересно, что во всех типах эндотелиоцитов было отмечено падение уровня экспрессии шаперонов через 48 ч культивирования, а затем резкий подъем через 72 ч.

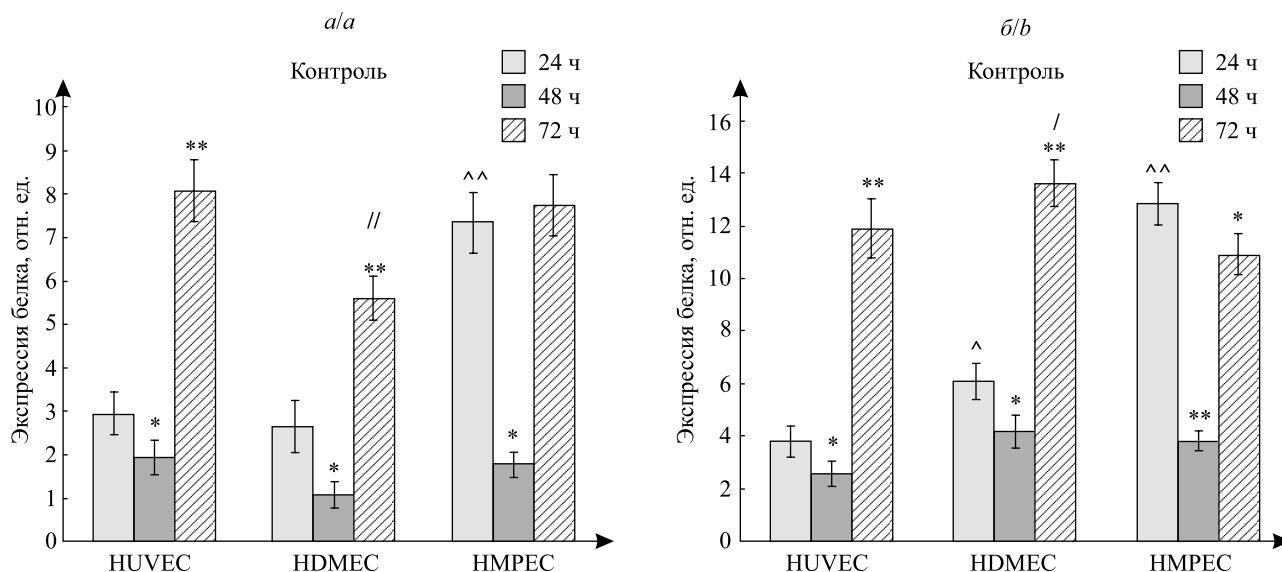


Рис. 1. Экспрессия белков GRP94 (а) и GRP78 (б) в эндотелиальных клетках HUVEC, HDMEC и HMPEC при стандартных условиях культивирования (37 °С, 5 % CO₂, 95 % воздуха) (клетки контроля):
* и ** – различия достоверны по отношению к клеткам, которые культивировали 24 ч, при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно (сравнения проводили внутри каждой группы клеток); ^ и ^^ – различия достоверны по отношению к клеткам HUVEC и HDMEC, которые культивировали 24 ч, при $p < 0,01$; / – различия достоверны по отношению к клеткам HMPEC, которые культивировали 72 ч, при $p < 0,05$; // – различия достоверны по отношению к клеткам HUVEC и HMPEC, которые культивировали 72 ч, при $p < 0,01$

Fig. 1. Expression of proteins GRP94 (a) and GRP78 (b) in the endothelial cells HUVEC, HDMEC and HMPEC under the standard conditions of cultivation (37 °C, 5 % CO₂, 95 % air) (control cells):
* and ** – the differences are significant in comparison to cells cultivated 24 h, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively (comparison was done in each group);
^ and ^^ – the differences are significant in comparison to HUVEC and HDMEC, cultivated 24 h, $p < 0.01$;
/ – the differences are significant in comparison to HMPEC, cultivated 72 h, $p < 0.05$;
// – the differences are significant in comparison to HUVEC and HMPEC, cultivated 72 h, $p < 0.01$

Экспрессия GRP94 и GRP78 в эндотелиальных клетках в условиях гипоксии. В эндотелиальных клетках HUVEC в условиях гипоксии (37 °С, 5 % CO₂, ≤1 % O₂) наблюдалось повышение экспрессии уровня GRP94 через 24, 48 и 72 ч по сравнению с клетками контроля ($p \leq 0,01$). Через 48 ч было зафиксировано максимальное повышение, уровень которого сохранился и через 72 ч инкубации в условиях гипоксии (рис. 2, а). Паттерн экспрессии GRP78 в HUVEC в условиях гипоксии сравним с GRP94 (рис. 3, а). Таким образом, в эндотелиальных клетках из пуповинной вены в условиях гипоксии усиливается экспрессия обоих белков, помогающих клетке адаптироваться к стрессовой ситуации.

На экспрессию GRP94 в эндотелиальных клетках HDMEC и HMPEC гипоксия влияла иначе. В условиях гипоксии через 24 ч инкубации уровень экспрессии GRP94 в этих клетках был сравним с таковым в клетках контроля (см. рис. 2, б и в), а через 48 ч экспрессия GRP94 существенно выросла по сравнению с клетками контроля ($p \leq 0,01$) (см. рис. 2, б и в). Через 72 ч инкубации в условиях гипоксии в эндотелиальных клетках HDMEC экспрессия GRP94 сохранилась на уровне 48 ч (гипоксия), превышая уровень контроля (72 ч) ($p \leq 0,01$) (см. рис. 2, б), а в клетках HMPEC экспрессия упала по сравнению с уровнем 48 ч (гипоксия) ($p \leq 0,01$) и была сравнима с уровнем контроля (72 ч) (см. рис. 2, в).

В целом в условиях экспериментальной гипоксии экспрессия GRP94 в микроциркуляторных эндотелиоцитах кожи (HDMEC) и плаценты (HMPEC) сравнима, но отличается от паттерна экспрессии в макроциркуляторных эндотелиоцитах пуповины (HUVEC), что, возможно, объясняется различиями в физиологических функциях сосудов микро- и макроциркуляторного русла [20].

В эндотелиальных клетках HDMEC в условиях гипоксии экспрессия GRP78 через 24 ч была сравнима с контролем (24 ч); через 48 ч выросла вдвое по сравнению с контролем (48 ч); через 72 ч возросла еще более чем в 2 раза по сравнению с контролем (72 ч). Паттерн экспрессии GRP78 в HDMEC в условиях гипоксии сравним с GRP94 (см. рис. 3, б).

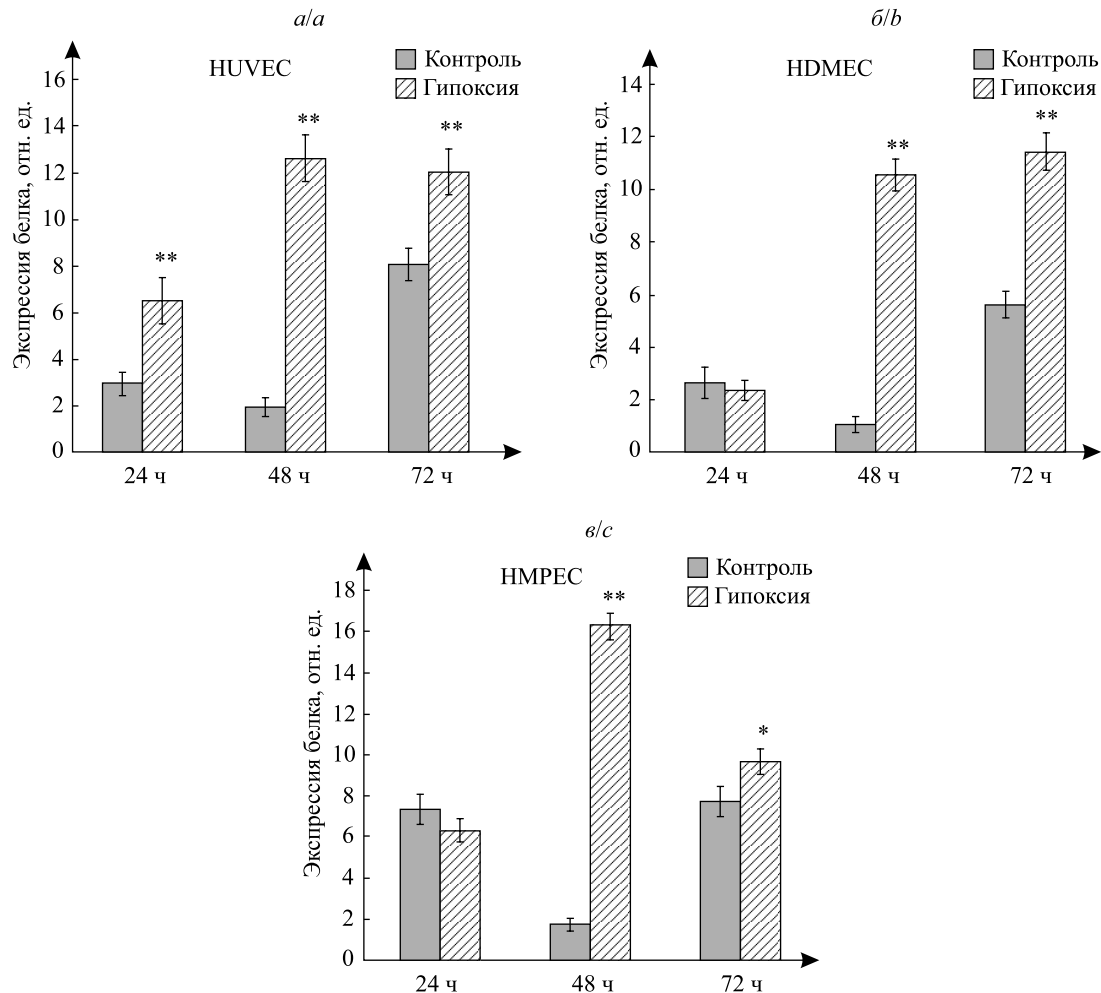


Рис. 2. Экспрессия белков GRP94 в эндотелиальных клетках HUVEC (а), HDMEC (б) и HMPEC (в) в условиях экспериментальной гипоксии (37 °C, 5 % CO₂, ≤ 1 % O₂): * и ** – различия достоверны по отношению к произведенному контролю при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно

Fig. 2. Expression of proteins GRP94 in the endothelial cells HUVEC (a), HDMEC (b), and HMPEC (c) under experimental hypoxia (37 °C, 5 % CO₂, ≤ 1 % O₂): * and ** – the differences are significant in comparison to the appropriate control, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively

В клетках HMPEC в условиях гипоксии паттерн экспрессии GRP78 отличался от такового в HUVEC и HDMEC, а также имел отличия от паттерна экспрессии GRP94 в HMPEC (см. рис. 3, в): через 24 ч инкубации в условиях гипоксии экспрессия GRP78 была ниже, чем в контроле (24 ч); через 48 ч экспрессия повысилась по сравнению с клетками, выращиваемыми 48 ч в стандартных условиях культивирования ($p \leq 0,01$), и клетками, выращиваемыми 24 ч в условиях гипоксии ($p \leq 0,01$), но уровень их экспрессии не превышал уровня экспрессии в клетках, которые росли в стандартных условиях 24 ч (см. рис. 3, в). Через 72 ч инкубации в условиях гипоксии экспрессия GRP78 увеличилась более чем в 5 раз по сравнению с клетками, которые росли 24 или 72 ч в стандартных условиях ($p \leq 0,01$) (см. рис. 3, в).

Через 72 ч инкубации в условиях гипоксии в микроциркуляторных эндотелиальных клетках HDMEC и HMPEC уровень экспрессии GRP78 был существенно выше, чем GRP94. Известно, что белки семейства Hsp70 являются высококонсервативными и их основная функция у различных организмов заключается в адаптации клетки к условиям стресса за счет восстановления нарушенной структуры белков. Накопление белков с поврежденной структурой запускает реакцию несвернутых белков (англ. *unfolded protein response*), главными сенсорами которой являются IRE1 (inositol requiring protein-1), PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) и ATF6 (activating transcription factor-6) [21–25]. В результате запускаются следующие механизмы, уменьшающие стрессовую нагрузку на клетку:

- ингибирование трансляции, снижающее уровень белков в ЭПР;
- активация белков-шаперонов, способствующих восстановлению белковой структуры [21–25].

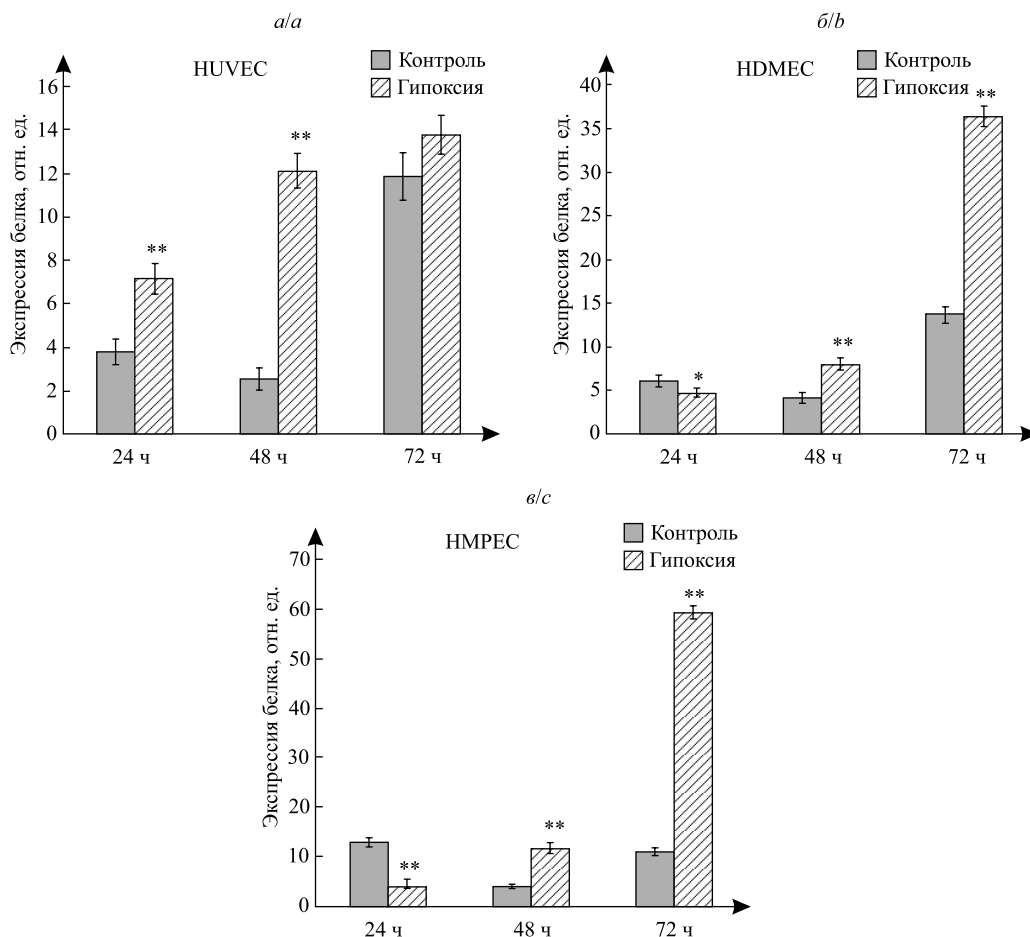


Рис. 3. Экспрессия белков GRP78 в эндотелиальных клетках HUVEC (а), HDMEC (б) и HMPEC (в) в условиях экспериментальной гипоксии (37 °C, 5 % CO₂, ≤ 1 % O₂):
* и ** – различия достоверны по отношению к произведенному контролю при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно

Fig. 3. Expression of proteins GRP78 in the endothelial cells HUVEC (a), HDMEC (b), and HMPEC (c) under experimental hypoxia (37 °C, 5 % CO₂, ≤ 1 % O₂):
* and ** – the differences are significant in comparison to the appropriate control, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively

Выводы

Экспрессия стрессовых белков-шаперонов GRP78 и GRP94 при стандартных условиях культивирования (37 °C, 5 % CO₂, 95 % воздуха) в эндотелиальных клетках HUVEC и HDMEC схожа, а в эндотелиоцитах HMPEC имеет отличия. В условиях гипоксии паттерн экспрессии меняется: появляются различия в экспрессии между эндотелиоцитами микроциркуляторного (HDMEC, HMPEC) и макроциркуляторного русла (HUVEC).

Библиографические ссылки

1. Hochachka P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia // Science. 1986. Vol. 231. P. 234–241.
2. Suarez R. K., Doll C. J., Buie A. E., et al. Turtles and rats: a biochemical comparison of anoxia-tolerant and anoxia-sensitive brains // Am. J. Physiol. 1989. Vol. 257. P. 1083–1088.
3. Nilsson G. E., Alfaro A. A., Lutz P. L. Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia // Am. J. Physiol. 1990. Vol. 259. P. 376–384.
4. Lee S. L., Fanburg B. L. Glycolytic activity and enhancement of serotonin uptake by endothelial cells exposed to hypoxia/anoxia // Circ. Res. 1987. Vol. 60, № 5. P. 653–658.
5. Ogawa S., Gerlach H., Esposito C., et al. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium // J. Clin. Invest. 1990. Vol. 85. P. 1090–1098.
6. Kourembanas S., Marsden P. A., McQuillan L. P., et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium // J. Clin. Invest. 1991. Vol. 88. P. 1054–1057.
7. Farber H. W., Rounds S. Effect of long-term hypoxia on cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells // Exp. Cell Res. 1990. Vol. 191. P. 27–36.

8. Farber H. W., Barnett H. F. Differences in prostaglandin metabolism in cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells exposed to acute and chronic hypoxia // *Circ. Res.* 1991. Vol. 68. P. 1446–1457.
9. Zimmerman L. H., Levine R. A., Farber H. W. Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells // *J. Clin. Invest.* 1991. Vol. 87. P. 908–914.
10. Kreisberg J. I., Mills J. W., Jarrell J. A., et al. Protection of cultured renal tubular epithelial cells from anoxic cell swelling and cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. Vol. 77. P. 5445–5447.
11. Schwartz P., Piper H. M., Spahr R., et al. Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation // *Am. J. Pathol.* 1984. Vol. 115. P. 349–361.
12. Santoro M. G. Heat shock factors and the control of the stress response // *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 59, № 1. P. 55–63.
13. Nollen E. A., Morimoto R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing «heat shock» proteins // *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 115. P. 2809–2816.
14. Sangster T. A., Lindquist S., Queitsch C. Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance // *Bioessays.* 2004. Vol. 26. P. 348–362.
15. De Los Rio P., Ben-Zvi A., Slutsky O., et al. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, № 16. P. 6166–6172.
16. Floer M., Bryant G. O., Ptashne M. HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, № 8. P. 2975–2980.
17. Van P. N., Peter F., Söling H. D. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 29. P. 17494–17501.
18. Laemmli U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, issue 5259. P. 680–685.
19. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming // *J. Physiol.* 2006. Vol. 572, № 1. P. 25–30.
20. Wiernsperger N. F., Bouskela E. Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication // *Diabetes Metab.* 2003. Vol. 29, № 4. P. 6S77–87.
21. Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. Vol. 8. P. 519–529.
22. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 13. P. 89–102.
23. Osowski C. M., Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system // *Methods Enzymol.* 2011. Vol. 490. P. 71–92.
24. Chakrabarti A., Chen A. W., Varner J. D. A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. Vol. 108, № 12. P. 2777–2793.
25. Liu C. Y., Kaufman R. J. The unfolded protein response // *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, № 10. P. 1861–1862.

References

1. Hochachka P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science.* 1986. Vol. 231. P. 234–241.
2. Suarez R. K., Doll C. J., Buie A. E., et al. Turtles and rats: a biochemical comparison of anoxia-tolerant and anoxia-sensitive brains. *Am. J. Physiol.* 1989. Vol. 257. P. 1083–1088.
3. Nilsson G. E., Alfaro A. A., Lutz P. L. Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia. *Am. J. Physiol.* 1990. Vol. 259. P. 376–384.
4. Lee S. L., Fanburg B. L. Glycolytic activity and enhancement of serotonin uptake by endothelial cells exposed to hypoxia/anoxia. *Circ. Res.* 1987. Vol. 60, No. 5. P. 653–658. DOI: 10.1161/01.RES.60.5.653.
5. Ogawa S., Gerlach H., Esposito C., et al. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. *J. Clin. Invest.* 1990. Vol. 85. P. 1090–1098. DOI: 10.1172/JCI114540.
6. Kourembanas S., Marsden P. A., McQuillan L. P., et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.* 1991. Vol. 88. P. 1054–1057. DOI: 10.1172/JCI116604.
7. Farber H. W., Rounds S. Effect of long-term hypoxia on cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 1990. Vol. 191. P. 27–36.
8. Farber H. W., Barnett H. F. Differences in prostaglandin metabolism in cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells exposed to acute and chronic hypoxia. *Circ. Res.* 1991. Vol. 68. P. 1446–1457. DOI: 10.1161/01.RES.68.5.1446.
9. Zimmerman L. H., Levine R. A., Farber H. W. Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1991. Vol. 87. P. 908–914.
10. Kreisberg J. I., Mills J. W., Jarrell J. A., et al. Protection of cultured renal tubular epithelial cells from anoxic cell swelling and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. Vol. 77. P. 5445–5447.
11. Schwartz P., Piper H. M., Spahr R., et al. Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Pathol.* 1984. Vol. 115. P. 349–361.
12. Santoro M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 59, No. 1. P. 55–63.
13. Nollen E. A., Morimoto R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing «heat shock» proteins. *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 115. P. 2809–2816.
14. Sangster T. A., Lindquist S., Queitsch C. Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. *Bioessays.* 2004. Vol. 26. P. 348–362. DOI: 10.1002/bies.20020.
15. De Los Rio P., Ben-Zvi A., Slutsky O., et al. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, No. 16. P. 6166–6172. DOI: 10.1073/pnas.0510496103.
16. Floer M., Bryant G. O., Ptashne M. HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, No. 8. P. 2975–2980. DOI: 10.1073/pnas.0800053105.

17. Van P. N., Peter F., Söling H. D. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles. *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, No. 29. P. 17494–17501.
18. Laemmli U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227, issue 5259. P. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
19. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.* 2006. Vol. 572, No. 1. P. 25–30. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.104968.
20. Wiernsperger N. F., Bouskela E. Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication. *Diabetes Metab.* 2003. Vol. 29, No. 4. P. 6S77–87. DOI: 10.1016/S1262-3636(03)72791-8.
21. Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. Vol. 8. P. 519–529. DOI: 10.1038/nrm2199.
22. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 13. P. 89–102. DOI: 10.1038/nrm3270.
23. Osowski C. M., Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* 2011. Vol. 490. P. 71–92. DOI: 10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0.
24. Chakrabarti A., Chen A. W., Varner J. D. A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response. *Biotechnol. Bioeng.* 2011. Vol. 108, No. 12. P. 2777–2793. DOI: 10.1002/bit.23282.
25. Liu C. Y., Kaufman R. J. The unfolded protein response. *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, No. 10. P. 1861–1862.

Статья поступила в редколлегию 25.04.2017.
Received by editorial board 25.04.2017.