

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-018: 576.34

© Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА И ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА НА НЕИШЕМИЗИРОВАННЫЕ И ИШЕМИЗИРОВАННЫЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

М. В. БИЛЕНКО, В. Г. ЛАДЫГИНА, С. В. ФЕДОСОВА

Институт Биомедицинской Химии РАМН, Москва, 119832, Погодинская ул., д. 10.

Факс: 7 (095) 245-08-57.

В работе изучен цитотоксический (ЦТ) эффект инициаторов свободно-радикальных реакций (СРР): H_2O_2 (10^{-6} — 10^{-9} М), рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа человека (ФНО- α) (0,05—100 нг/мл) и сочетания ФНО- α (0,5 и 50 нг/мл) с липопротеинами низкой плотности (ЛНП, 100 мкг/мл) на конфлюэнтную культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (ЭКПВЧ). Совместную инкубацию ЭКПВЧ с перечисленными соединениями проводили при 37 °С в течение 6 или 24 ч параллельно в аэробных условиях (CO_2 -инкубаторе) и в условиях ишемии (инкубация клеток в среде RPMI-1640 без субстратных добавок, фактора роста и белка в камере, заполненной газовой смесью: 95% N_2 + 5% CO_2). Жизнеспособность ЭКПВЧ определяли по числу клеток, прикрепившихся ко дну ячеек через 24 ч после пересева и реинкубации в аэробных условиях в среде роста (Plating Efficiency Index).

Опыты показали: 1) ЦТ эффект исследованных соединений носил дозо-зависимый (H_2O_2 и ФНО- α) и время-зависимый (ФНО- α) характер; 2) ЦТ эффект всех соединений был синергичен с действием ишемии, т. е. сопровождался достоверно более резким снижением процента жизнеспособных клеток, по сравнению с каждым из факторов и ишемией в отдельности; 3) ЦТ эффект ФНО- α возрастал при использовании субстрат-дефицитной безбелковой среды по сравнению со средой роста; 4) комбинация ФНО- α и ЛНП оказывала более резкое ЦТ действие на ЭКПВЧ, чем каждое из воздействий в отдельности, причем синергичный эффект ФНО- α и ЛНП был особенно резко выражен при инкубации ЭКПВЧ в условиях ишемии.

Таким образом, инициаторы СРР и, особенно ФНО- α + ЛНП могут усугублять ишемические повреждения ЭК и, вследствие этого, в условиях гиперхолестеринемии predisposing стенку сосудов к возникновению атеросклероза.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, ишемия, перекись водорода, фактор некроза опухоли α , липопротеины низкой плотности.

ВЕДЕНИЕ. Сосудистые эндотелиальные клетки (ЭК) являются высоко чувствительными клетками - мишенями для эндогенных и экзогенных инициаторов свободно-радикальных реакций (СРР). Об этом свидетельствует выраженный цитотоксический (ЦТ) эффект на культуру ЭК перекиси водорода (H_2O_2) [1, 2]; параквата [2]; системы ксантин / ксантиноксидаза [3]; липопротеинов низкой плотности (ЛНП) [4-6]. В последние годы показано, что сосудистый эндотелий высоко чувствителен также к фактору не-

роза опухоли альфа (ФНО- α) [7], ЦТ эффект которого в значительной степени обусловлен индукцией внутриклеточного образования активных форм кислорода (АФК), инициирующих СРР [8, 9] и проявляется как в условиях *in vivo* [10], так и при добавлении ФНО- α в культуру ЭК *in vitro* [11, 12].

Несмотря на пограничное с кровью положение, сосудистый эндотелий *in vivo* часто подвергается смене состояний ишемия/реперфузия, сопровождающих гипертонию, очаговый спазм сосуда, временную окклюзию сосуда, ишемию органа [13, 14]. Известно, что при таких ситуациях в ЭК возрастает продукция АФК [15, 16], а в крови увеличивается содержание ФНО- α [17-19].

Исходя из сказанного, естественно предположить, что временная ишемия сосудистой стенки в сочетании с ростом концентрации инициаторов СРР, в том числе H_2O_2 и ФНО- α , могут создать критическую ситуацию и привести к более выраженным повреждениям ЭК, однако это предположение экспериментальной проверке не подвергалось.

Показано также, что инкубация ЭК пупочной вены человека (ЭКПВЧ) с высокими дозами ФНО- α [20] сопровождается ростом проницаемости ЭК для ЛНП, а ФНО- α , часто выявляется именно в местах атеросклеротических повреждений сосудистой стенки [12], то есть ФНО- α в условиях гиперхолестеринемии (и повышенного содержания ЛНП в крови) может усугубить повреждение сосудистой стенки и способствовать ее атеросклерозу. Однако проверки этого предположения мы в литературе не нашли. В связи с вышесказанным, целью настоящей работы явилась сравнительная оценка ЦТ эффекта инициаторов СРР - H_2O_2 , ФНО- α и сочетания ФНО- α с ЛНП на культуру ЭКПВЧ, инкубируемую в обычных условиях или в условиях ишемии.

МЕТОДИКА. Опыты проведены на конфлюэнтных культурах ЭКПВЧ 2 и 3 пассажей. Клетки выделяли из вены пупочного канатика плода не позднее 6 ч после нормальных родов с помощью 0,1% раствора коллагеназы (Sigma, США), и инкубировали, а после 2 и 3 пассажей реинкубировали в CO_2 -инкубаторе (Assab, Швеция), продуваемом воздухом с 5% CO_2 , в течение 7 дней. Использовали среду роста с pH 7,4, состоящую из RPMI-1640 (Flow, Англия) с добавлением на каждые 100 мл: Na-бикарбоната (7,5 г), HEPES (15 мл), Na-пирувата (100 мМ, 1 мл), L-глутамин (200 мМ, 1 мл), (Sigma, США), фактора роста ЭК (ФРЭК, 1,5 мг), эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ, 10 мл) (ИЭМ им. Н. Ф. Гамалея) и гентамицина (30000 ЕД) (Pharmachim, Болгария). Среду стерилизовали с помощью фильтров 0,45 мкм (Sera, США). Инкубацию проводили в планшетах на 24 ячейки (Costar, Нидерланды). Каждая ячейка содержала около 10^5 клеток. Во время опыта (инкубация 6 или 24 ч при 37 °C), проводимого параллельно в аэробных условиях и условиях ишемии, среду «роста» заменяли на «инкубационную» среду, состоящую из RPMI-1640+Na-бикарбонат без остальных добавок, pH 7,4, в сниженном вдвое объеме (0,5 мл на ячейку площадью 2 см²). Аэробную инкубацию проводили в CO_2 -инкубаторе. Ишемию моделировали путем помещения планшеты с ЭКПВЧ в камеру, в течение 10 мин продуваемую не менее, чем 10-кратным объемом газовой смеси, состоящей из 95% N_2 и 5% CO_2 , (примесь O_2 в газовой смеси менее 0,001%), после чего камеру помещали в CO_2 -инкубатор при 37 °C. Использование субстрат-дефицитной безбелковой среды в сочетании с аноксией близко имитировало stop-flow модель ишемии *in vivo* [21]. По окончании заданного срока инкубации среду удаляли и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Клетки, оставшиеся на дне ячеек, отмывали раствором PBS (Sigma, США), отделяли от дна с помощью смеси 0,1% трипсина и 0,02% ЭДТА (Sigma, США) и вместе с осадком, оставшемся после центрифугирования, пересевали в соотношении 1:2 в среду «роста» для дальнейшей 24 ч реинкубации в CO_2 -инкубаторе при 37 °C. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью Plating Efficiency Index (PEI) [22], а именно по количеству ЭКПВЧ, заново прикрепившихся ко дну ячеек и пересчитанных в % к числу клеток в контрольных ячейках.

Исходную концентрацию H_2O_2 измеряли на спектрофотометре СФ-46 по поглощению при длине волны 240 нм и рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, равный 46,3. Рекомбинантный ФНО- α человека получали в лаборатории В. Г. Коробко (Институт Биоорганической Химии РАН им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова). ЛНП выделяли из плазмы крови здоровых доноров методом препаративного ультрацентрифугирования [23] и диализировали в мешочках (Serva, США) против 6000 объемов 10 мМ фосфатного буфера с pH 7,4. Антиоксиданты не использовали, вследствие чего ЛНП имели слабую степень окисленности, оцененную по содержанию в них ТБК-реактивных продуктов [24] (около 1,2 нмоль МДА/мг белка). ЛНП дозировали по белку, который определяли методом Лоури. Каждую концентрацию использованных препаратов испытывали в 3-4 ячейках, данные усредняли. Статистическую обработку проводили, используя критерий Стьюдента для малых выборок. Данные представляли как среднее значение \pm средняя квадратичная ошибка ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ:

I. Изучение ЦТ эффекта H_2O_2 на ЭКПВЧ после их совместной инкубации в аэробных условиях или условиях ишемии.

H_2O_2 добавляли в ячейки с ЭКПВЧ перед началом инкубации в конечных концентрациях 10^{-9} - 10^{-6} М, инкубацию проводили в течение 6 ч. Из данных, представленных на рис. 1 видно, что в условиях аэробной инкубации (столбики а) жизнеспособность ЭКПВЧ снижалась по мере увеличения концентрации H_2O_2 в среде, т. е. ЦТ эффект H_2O_2 носил дозо-зависимый характер. Потеря 50% жизнеспособности (ЛД_{50}) происходила в интервале концентраций H_2O_2 10^{-7} и 10^{-8} М. В контрольных опытах с инкубацией ЭКПВЧ в условиях ишемии (K_2) процент выживших клеток был достоверно ниже, чем в контрольных опытах, проведенных в аэробных условиях (K_1) ($P < 0,01$). ЦТ эффект H_2O_2 на ЭКПВЧ, инкубированные в условиях ишемии (столбики б), сохранял дозо-зависимый характер, причем процент выживших клеток был достоверно ниже, чем в опытах с аэробной инкубацией ($P < 0,05$ - $0,01$) и достоверно ниже, чем в опытах с ишемией без H_2O_2 ($^{\circ} < 0,01$). Более выраженный ЦТ эффект сочетания H_2O_2 + ишемия по сравнению с каждым из воздействий в отдельности свидетельствует о синергизме ЦТ эффекта ишемии и H_2O_2 .

II. Изучение ЦТ эффекта ФНО- α на ЭКПВЧ после их совместной инкубации в аэробных условиях или условиях ишемии.

ФНО- α добавляли в ячейки с ЭКПВЧ перед началом инкубации в конечных концентрациях 0,05-100 нг/мл, инкубацию проводили в течение 6 и 24 ч. Данные представлены на рис. 2 и в таблицах 1 и 2.

Как видно из рис. 2, ЦТ эффект ФНО- α на ЭКПВЧ после 6 и 24 ч инкубации в аэробных условиях (I и II соответственно, столбики а) был достоверно выражен уже в концентрации 0,05 нг/мл и существенно возрастал (а процент жизнеспособных ЭКПВЧ падал) по мере увеличения концентрации ФНО- α . Потерю 50% жизнеспособности (ЛД_{50}) ФНО- α после 6 ч аэробной инкубации вызывал в концентрации, примерно равной 50 нг/мл, а после 24 ч инкубации - в концентрации, близкой к 0,5 нг/мл.

Дозо-зависимый ЦТ эффект ФНО- α сохранялся и после 6 и 24 ч инкубации ФНО- α с ЭКПВЧ в условиях ишемии, причем при всех концентрациях ФНО- α % жизнеспособных клеток был достоверно ниже, чем в контрольных опытах с 6 и 24 ч ишемией ($^{\circ} < 0,05$ - $0,01$), и в большинстве опытов был достоверно ниже, чем с той же концентрацией ФНО- α в условиях аэробной инкубации ($P < 0,05$ - $0,01$). Это свидетельствует о том, что ЦТ эффект ишемия + ФНО- α , при обоих сроках инкубации, так же как ЦТ эффект ишемия + H_2O_2 после 6 ч инкубации, носил синергичный характер, совместно повреждая существенно большее число ЭКПВЧ, чем каждое из воздействий в отдельности.

Сопоставление ЦТ эффекта ФНО- α после 6 и 24 ч инкубации с ЭКПВЧ показало (таблица 1), что процент жизнеспособных ЭКПВЧ после 24 ч инкубации был достоверно

ниже, чем после 6 ч инкубации при всех использованных концентрациях ФНО-α как в аэробных условиях инкубации, так и в условиях ишемии, то есть ЦТ эффект ФНО-α носил не только дозо-зависимый, но и время-зависимый характер.

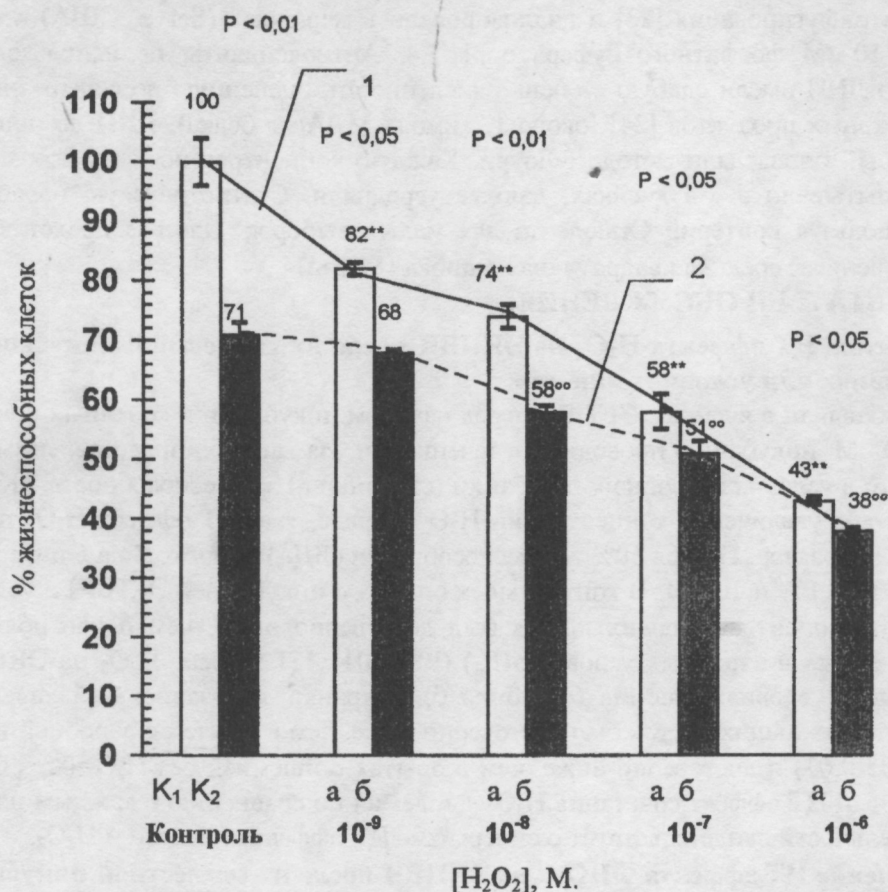


Рисунок 1.

ЦТ эффект H₂O₂ на ЭКПВЧ при их совместной инкубации в аэробных условиях (а) и в условиях ишемии (б) в течение 6 ч (M ± m). K₁ - число жизнеспособных клеток после аэробной инкубации без H₂O₂; K₂ - то же после инкубации в условиях ишемии; K₂ и остальные данные приведены в процентах к K₁, принятому за 100%. *.-** - достоверность различий с K₁: * < 0,05; ** < 0,01. °° - достоверность различий с K₂: < 0,01. P - достоверность различий между а и б. 1 и 2 - кривые снижения процента жизнеспособных ЭКПВЧ в зависимости от концентрации H₂O₂: 1 - аэробная инкубация, 2 - инкубация в условиях ишемии. Проведено 3 серии экспериментов.

При 24 ч инкубации существенное влияние на ЦТ эффект ФНО-α оказывала среда инкубации. Как видно из таблицы 2 как в аэробных условиях, так и в условиях ишемии, процент жизнеспособных клеток в опытах с высокой дозой ФНО-α (50 нг/мл) был достоверно выше при использовании среды «роста» по сравнению с субстрат-дефицитной безбелковой средой «инкубации». Среда «роста» защищала ЭКПВЧ и от ишемических повреждений, а также увеличивала число клеток после 24 ч их аэробной инкубации (возможно за счет их размножения).

III. Изучение ЦТ эффекта ФНО-α + ЛНП на ЭКПВЧ после их совместной инкубации в аэробных условиях и в условиях ишемии.

ФНО-α использовали в концентрациях 0,5 и 50 нг/мл, ЛНП - в концентрации 100 мкг/мл. Оба препарата добавляли в ячейки с ЭКПВЧ перед началом инкубации,

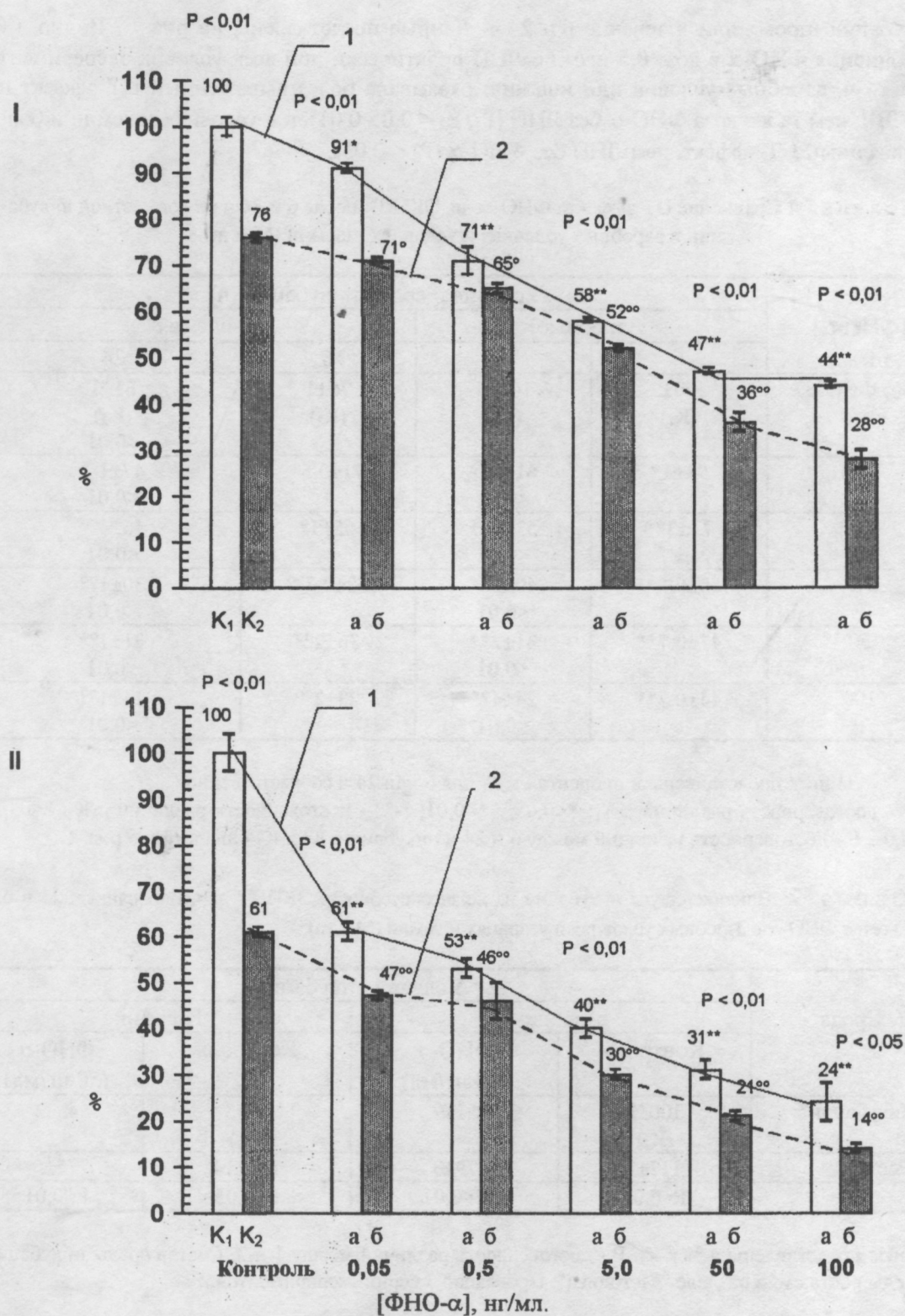


Рисунок 2.

ЦТ эффект ФНО-α на ЭКПВЧ при их совместной инкубации в аэробных условиях (а) и условиях ишемии (б) в течение 6 (I) и 24 ч (II) ($M \pm m$).
Данные приведены в процентах к K_1 , принятому за 100%. K_1 , K_2 , *—**, °—°, P, 1 и 2 аналогичны рис. 1. Проведено по 3 серии экспериментов с каждым сроком инкубации.

инкубацию проводили в течение 6 и 24 ч. Данные представлены на рис. 3. Видно, что комбинация ФНО- α в дозе 0,5 нг/мл с ЛНП практически при всех условиях эксперимента (6 и 24 ч, аэробные условия или ишемия) оказывала более выраженный ЦТ эффект на ЭКПВЧ, чем та же доза ФНО- α без ЛНП ($P_1, P_2 < 0,05-0,01$), а в условиях ишемии и более выраженный ЦТ эффект, чем ЛНП без ФНО- α ($P_3 < 0,05$).

Т а б л и ц а . 1 Сравнение ЦТ эффекта ФНО- α на ЭКПВЧ после 6 и 24 ч их совместной инкубации в аэробных условиях и условиях ишемии ($M \pm m$)

[ФНО- α] нг/мл	Условия и сроки инкубации (ч)			
	Аэробные		Ишемия	
	6	24	6	24
Без ФНО- α	100 \pm 2 (K_1)	100 \pm 4 (K_1)	76 \pm 1 (K_2)	61 \pm 1 (K_2)
P				<0,01
0,05	91 \pm 1*	61 \pm 2**	71 \pm 0,5°	47 \pm 1°°
P		<0,01		<0,01
0,5	71 \pm 3**	53 \pm 2**	65 \pm 1°	46 \pm 4°°
P		<0,01		<0,01
5,0	58 \pm 0,5**	40 \pm 2**	52 \pm 0,7°°	30 \pm 1°°
P		<0,01		<0,01
50	47 \pm 0,7**	31 \pm 2**	36 \pm 2°°	21 \pm 1°°
P		<0,01		<0,01
100	44 \pm 0,7**	24 \pm 4**	28 \pm 2°°	14 \pm 1°°
P		<0,01		<0,01

Данные представлены в процентах к K_1 для 6 или 24 ч соответственно.

*** - достоверность различий с K_1 : *<0,05, **<0,01; °-°° - достоверность различий с K_2 : °<0,05; °°<0,01. P - достоверность различий между 6 и 24 ч инкубации. K_1 и K_2 - аналогично рис. 1.

Т а б л и ц а . 2 Влияние среды инкубации на жизнеспособность ЭКПВЧ, инкубированных 24 ч без ФНО- α и с ФНО- α в аэробных условиях и условиях ишемии ($M \pm m$)

Среда	Условия инкубации			
	Аэробные		Ишемия	
	Контроль	ФНО- α (50 нг/мл)	Контроль	ФНО- α (50 нг/мл)
1. "Инкубации"	100 \pm 3 (K_1)	51 \pm 2	68 \pm 3 (K_2)	43 \pm 3
2. "Роста"	112 \pm 2	79 \pm 3	104 \pm 14	75 \pm 5
	P<0,05	P<0,01	P<0,05	P<0,01

Данные представлены в % к K_1 . P - достоверность различий между 1 и 2. Состав среды инкубации и среды роста см. в разделе "Методика". Проведено 3 серии экспериментов.

Комбинация ФНО- α в дозе 50 нг/мл с ЛНП оказывала более выраженный ЦТ эффект на ЭКПВЧ по сравнению с одним ФНО- α или одними ЛНП после 6 ч инкубации ($P_2, P_3 < 0,05$), или по сравнению с одними ЛНП после 24 ч инкубации ($P_3 < 0,01$) в условиях ишемии. Таким образом, сочетание этих двух факторов оказывало на ЭКПВЧ синергичный ЦТ эффект и, что важно подчеркнуть, этот синергизм наиболее резко проявлялся в условиях ишемии.

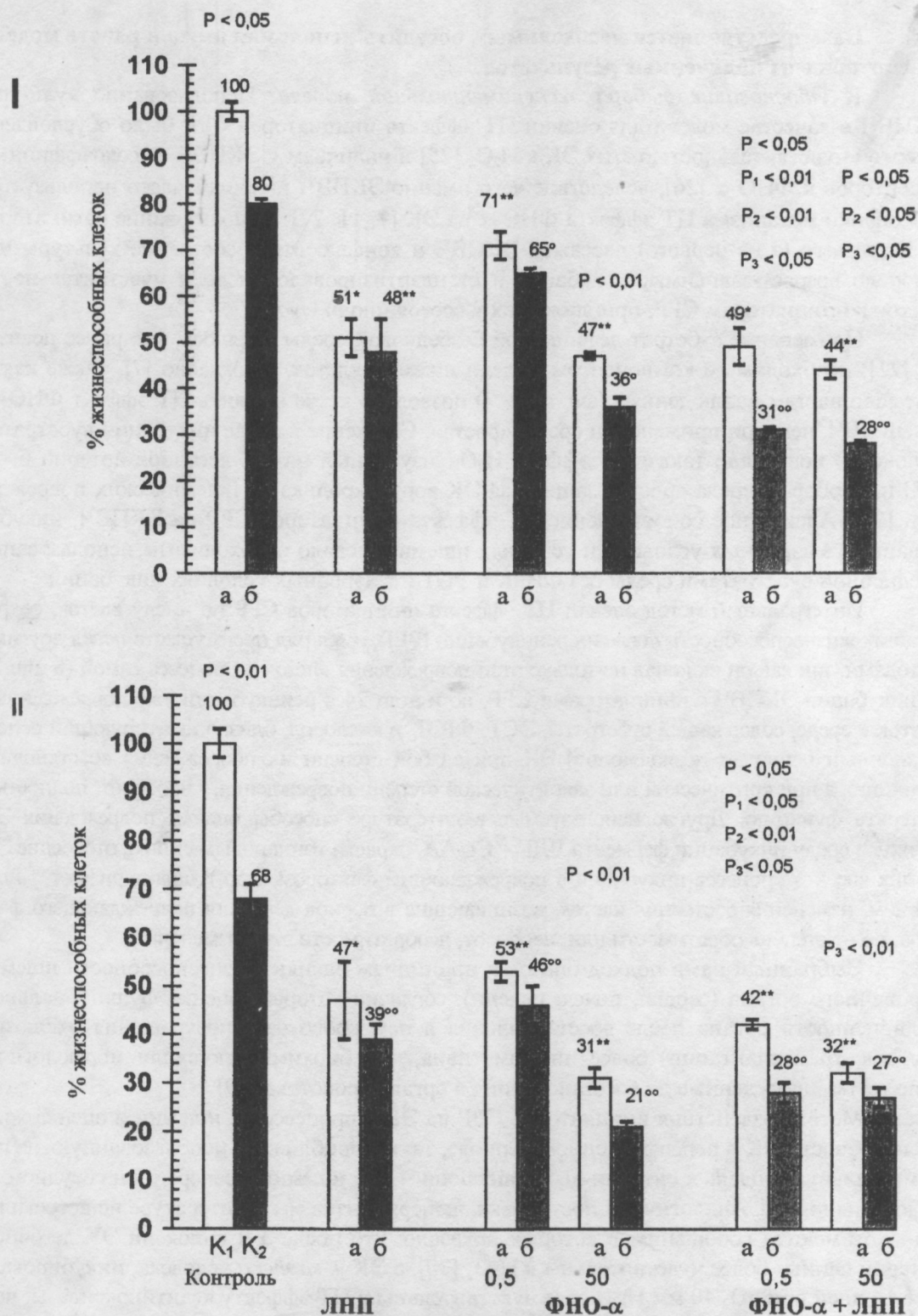


Рисунок 3.

ЦТ эффект комбинации ФНО- α + ЛНП на ЭКПВЧ при их совместной инкубации в аэробных условиях (а) и условиях ишемии (б) в течение 6 (I) и 24 ч (II) [M \pm m].

Данные приведены в процентах к K₁, принятому за 100%. K₁, K₂, *, **, °, °°, P, аналогичны рис. 1. P₁ - достоверность различий между опытами с ФНО- α + ЛНП и опытами с той же дозой одного ФНО- α в аэробных условиях. P₂ - то же в условиях ишемии. P₃ - достоверность различий между опытами ФНО- α + ЛНП и опытами с одними ЛНП в условиях ишемии. Проведено 2 серии экспериментов с 6 ч и 4 серии с 24 ч инкубации.

Нам представляется необходимым обсудить использованную в работе модель и некоторые из полученных результатов.

1. *Обоснование выбора экспериментальной модели.* Использование культуры ЭКПВЧ в качестве модели для оценки ЦТ эффекта инициаторов СРР было обусловлено высокой чувствительностью этих ЭК к H_2O_2 [25] и наличием у ЭКПВЧ высокоаффинных рецепторов к ФНО- α [26], вследствие чего именно ЭКПВЧ наиболее часто используется для оценки механизма ЦТ эффекта ФНО- α на ЭК [7, 11, 27]. Использование нами второго и третьего (а не первого) пассажей ЭКПВЧ и конфлюентное состояние культуры исключало возраст-зависимые колебания и стандартизировало число и чувствительность клеток к инициаторам СРР, приближая их к состоянию *in vivo*.

Применение субстрат-дефицитной безбелковой среды являлось, как ранее показано [21], необходимым компонентом модели ишемии клеток, а согласно [7], также как и согласно нашим наблюдениям (см. табл. 2) позволяло четче выявить ЦТ эффект ФНО- α , на ЭКПВЧ, чем при применении среды «роста». Снижение в среде инкубации субстратов (глюкозы) повышало также ЦТ эффект H_2O_2 , изученный на ЭК легочной артерии быка [28] и, наоборот, среда «роста» защищала ЭК аорты кролика от ишемических повреждений [21]. Адекватное сопоставление ЦТ эффекта инициаторов СРР на ЭКПВЧ, инкубированные в аэробных условиях и условиях ишемии, делало необходимым использование обедненной субстратами среды без ФРЭК и ЭСТ и в аэробных условиях инкубации.

Интегральный метод оценки ЦТ эффекта инициаторов СРР по числу клеток, сохранивших жизнеспособность после их реинкубации (РЕИ), имел ряд преимуществ перед другими методами, так как он включал не только этап повреждения клеток в процессе самой (6 или 24 ч) инкубации ЭКПВЧ с инициаторами СРР, но и этап 24 ч реинкубации уже поврежденных клеток в среде, содержащей субстраты, ЭСТ, ФРЭК и кислород, близко имитирующий реперфузионный период и позволяющий ЭК при слабой степени их повреждения восстановить функцию, а при критической или закритической степени повреждения, - наоборот, полностью потерять функцию. Другие используемые в литературе способы оценки повреждения ЭК (выход в среду инкубации фермента ЛДГ, ^{51}Cr , АА, окраска трипановым синим, отслоение ЭК от дна ячеек в процессе инкубации с повреждающим фактором и др.) характеризуют, в основном, изменения состояния клеток, возникающие в период действия повреждающего фактора, но не степень обратимости или, наоборот, необратимости этих изменений.

Выбранный нами подход близок к принципам оценки жизнеспособности ишемизированного органа (сердца, почек, печени), согласно которым оценка функциональной полноценности органа после восстановления в нем кровотока (прекращения окклюзии сосудов, трансплантации) более информативна, чем биохимические или морфологические тесты, проведенные до восстановления в органе кровотока [29].

Метод воздействия инициаторов СРР на ЭК в процессе их ишемии и оценка жизнеспособности ЭК в реперфузионном периоде, также приближает использованную экспериментальную модель к ситуациям, возникающим при ишемии / реперфузии сосудистого эндотелия *in vivo*. Аналогичной постановки экспериментов мы в литературе не встретили. Однако имеются сообщения, в которых показано, что после 3 ч гипоксии ЭК легочной артерии свиньи более чувствительны к H_2O_2 [30], а ЭК *v. saphena* человека, инкубированные 14 дней при pO_2 40 мм Hg, более чувствительны к ЦТ эффекту ксантиноксидазы, чем инкубированные при pO_2 150 мм Hg [31], что авторы связывают с падением в процессе длительной гипоксии содержания антиоксидантов, повышающим чувствительность ЭК к прооксидантам. Несмотря на методические различия и, возможно, разные механизмы повреждающего эффекта, конечный результат, а именно усиление ЦТ эффекта инициаторов СРР на ЭК во время или после инкубации в условиях O_2 дефицита по данным этих авторов и по нашим данным совпадают.

2. *Оценка дозо- и время-зависимого ЦТ эффектов инициаторов СРР.* Дозозависимым ЦТ эффектом, согласно выше приведенным данным, обладали и H_2O_2 и

ФНО- α . Эти результаты согласуются с данными, полученными при оценке ЦТ эффекта H_2O_2 [1, 32] и ЦТ эффекта ФНО- α [7, 11, 12] в аэробных условиях ЭК легочной артерии крыс, аорты свиней, ЭКПВЧ.

Время-зависимый эффект для H_2O_2 нами не был исследован, так как 6 ч срок инкубации H_2O_2 с ЭКПВЧ намного превышал сроки жизни H_2O_2 в среде инкубации. В то же время при более коротких сроках (30 мин инкубации) время-зависимый ЦТ эффект H_2O_2 был показан на ЭК легочной артерии крыс [32] или аорты свиньи [33].

Время-зависимый характер ЦТ эффекта ФНО- α или ФНО- α + ЛНП, выявленный нами при сравнении 6 и 24 ч инкубации, согласуется с наблюдениями других авторов [7, 11, 34]. ЦТ эффект ФНО- α на ЭК в условиях аэробной инкубации, оцененный по критерию выхода в среду инкубации ^{51}Cr , был отчетливым уже после 1-2 ч и максимальным после 4-6 ч инкубации [7, 11]; по критерию возникновения апоптоза - после 6-8 ч и 24 ч соответственно [34]. Время-зависимым повреждающим эффектом обладала и сама ишемия, при которой после 6 и 24 ч сохранялось $76 \pm 1\%$ и $61 \pm 1\%$ ($P < 0,01$) жизнеспособных ЭКПВЧ. Сопоставление последних данных с данными литературы затруднительно из-за различий в ЭК и способах создания ишемии.

3. *Возможные механизмы ЦТ эффекта инициаторов СРР и причины его синергизма с ЦТ эффектом ишемии.* ЦТ эффект инициаторов СРР на ЭК, как уже упоминалось выше, в значительной степени, по-видимому, обусловлен образованием в самих в ЭК АФК ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $^{\cdot}\text{OH}$), к основным продуцентам которых относят липоксигеназу и ксантиноксидазу при обязательном участии металлов переменной валентности (в основном, Fe^{2+}), причем имеется некоторая зависимость образующихся АФК от инициатора СРР. Используемые нами инициаторы СРР (H_2O_2 и ФНО- α) преимущественно продуцируют $\text{O}_2^{\cdot-}$ [1, 35]. Механизмы, ведущие к потере жизнеспособности ЭКПВЧ под влиянием инициаторов СРР (в частности H_2O_2) зависят от использованных доз, и при низких дозах вызывают апоптоз, а при высоких - ведут к некрозу [36].

ФНО- α согласно имеющимся данным, вызывает гибель ЭК преимущественно путем апоптоза [27, 34], что обусловлено его свободно-радикальными и сфингозин- и церамид-продуцирующими свойствами [37].

При ишемии/реперфузии отдельных клеток или целых органов, как известно, одним из существенных механизмов повреждающего действия является усиление в клетке СРР, чему способствует восстановленное состояние дыхательной цепи митохондрий, усиление активности фосфолипазы A_2 и обоих путей метаболизма арахидоновой кислоты, конверсия ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу, увеличение содержания в цитозоле низкомолекулярных комплексов железа и другие факторы [29]. При ишемии/реперфузии в ЭК увеличена продукция АФК [15, 16], которая возрастает и под влиянием инициаторов СРР, что, в частности, показано нами в опытах с ЛНП, которые резко окислялись под влиянием ишемизированных и реперфузированных ЭКПВЧ, по сравнению с неишемизированными ЭКПВЧ [5, 38].

Влиянием этих однонаправленных воздействий, по-видимому, в определенной степени можно объяснить выявленный нами синергичный эффект H_2O_2 , ФНО- α , ФНО- α + ЛНП и ишемии. Для ФНО- α синергизм ЦТ эффекта с ишемией, по-видимому, обусловлен также тем фактором, что образование ФНО- α может происходить не только в макрофагах, но и в самих ЭК ишемизированного и реперфузированного сердца [39], а также вследствие резкого снижения при ишемии синтеза белка [40], ингибция которого, как известно, существенно усиливает ФНО- α -индуцированный ЦТ эффект и апоптоз ЭК [11, 34]. При изучении ФНО- α -индуцированного апоптоза было также показано [34], что синергичный эффект ФНО- α и ингибитора синтеза белка (циклогексимида) был выражен лишь тогда, когда инкубацию ЭК легочной артерии быка с ФНО- α проводили до начала ингибции в ЭК белка, и продолжительность инкубации с ФНО- α была не менее 45-90 мин. Аналогичная ситуация, то есть последовательное включение повреждающих факторов, по-видимому, имела место и в наших

экспериментах, в которых ФНО- α (и тем более короткоживущая H_2O_2) начинали оказывать ЦТ эффект раньше, чем O_2 -дефицит, ведущий к ингибции белка и другим повреждениям в ЭК.

В заключение следует подчеркнуть следующие основные положения. На использованной нами экспериментальной модели все исследованные инициаторы СРР - H_2O_2 , рекомбинантный ФНО- α человека, слабо окисленные ЛНП и сочетание ФНО- α + ЛНП как в условиях аэробной инкубации, так и в условиях ишемии, оказывали выраженный ЦТ эффект, оцененный по снижению процента жизнеспособных ЭКПВЧ. ЦТ эффект носил, во-первых, дозо-зависимый характер (H_2O_2 и ФНО- α); во-вторых, усиливался при увеличении срока инкубации с 6 до 24 ч, то есть был время-зависим (ФНО- α , ФНО- α + ЛНП); в-третьих, был синергичен с ЦТ эффектом ишемии, что значительно повышало суммарное число погибших ЭК по сравнению с каждым из повреждающих факторов в отдельности (H_2O_2 , ФНО- α , ЛНП, ФНО- α + ЛНП); в-четвертых, был выражен значительно резче при использовании в период инкубации ЭКПВЧ субстрат-дефицитной и не содержащей белка среды по сравнению со средой роста (ФНО- α , ишемия); в-пятых, существенно увеличивался при совместном применении ФНО- α и ЛНП, что наиболее четко проявлялось при инкубации ЭКПВЧ в условиях ишемии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инициаторы СРР усугубляют повреждения сосудистого эндотелия, вызванные ишемией, а ФНО- α в условиях гиперхолестеринемии и повышенного содержания ЛНП в крови может быть фактором, предрасполагающим к развитию атеросклероза, особенно в участках сосудов, чаще других подвергающихся ишемии.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Markey B. A., Phan S. H., Varani J. et al. (1990), Free Rad. Biol. Med., 9, 307-314.
2. Britigan B. E., Roeder T. L. and Shasby D. M. (1992), Blood, 79, 699-707.
3. Shatos M.A., Doherty J.M. and Hoak J.C. (1991), Arteriosclerosis and Thrombosis, 11, 594-601.
4. Steinbrecher U. P., Parthasarathy S., Leake D. S. and Witztum J. L. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3883-3887.
5. Bilenko M.V., Fedosova S.V. and Ladygina V.G. (1996), Eur. Sec. Meet. ISHR Abstracts. J. Mol. Cell. Cardiol., 28, A31.
6. Биленко М. В., Ладыгина В. Г. и Федосова С.В. БЭБиМ, в печати.
7. Schuger L., Varani J., Marks R. M. et al. (1989), Lab. Invest. 61, 62-68.
8. Murphy H. S., Shayman J. A., Till G. O. et al. (1992), Am. J. Physiol., 263, 1, Pt1, L51-L59.
9. Adamson G. M. and Billings R. (1992), Arch. Biochem. Biophys., 294, 223-229.
10. Персидский Ю. В., Кудрявец Ю. И., Барштейн Ю. В. (1991), БЭБиМ, III, 3, 294-297.
11. Pohlman T. H. and Harlan J. M. Cell Immunology, (1989), 119, 41-52.

12. Yoshizumi M., Perrella M. A., Burnett J. C. and Lee M. E. (1993), *Circ. Res.*, **73**, 205-209.
13. Seidel S. L. and Strong R. (1986), *Hypertension*, **8**, 103-108.
14. Crawford D. W. and Kramsch D. M. (1988), *Exp. Mol. Pathology*, **49**, 215-233.
15. Schinetti M. L., Sbarbati R. and Scarlattini M. (1989), *Cardiovasc. Res.*, **23**, 1, 76-80.
16. Babbs C. F., Cregor M. D. and Badylak S. F. (1992), *Cardiovasc. Res.* **26**, 6, 593-602.
17. Dauber I. M., Parsons P. E., Welsh C. M. et al. (1993), *Circulation*, **88**, 2, 726-735.
18. Squadrito F., Altavilla D., Zingarelli B. et al. (1993), *Eur. J. Pharmacol.*, **237**, 2-3, 223-230.
19. Strenbergh W. C. 3rd, Tuttle T. M., Makhoul R. G. et al. (1994), *J. Vasc. Surgery*, **20**, 3, 474-481.
20. Langeler E. G., Fiers W. and van-Hinsbergh V. W. (1991), *Arteriosclerosis and Thrombosis*, **11**, 4, 872-881.
21. Bilenko M.V., Sevanian A. and Hochstein P. (1993), XIV Eur. Sec. Meet. ISHR. Abstracts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **25**, Suppl. 1, 85.
22. Hodis H.N., Kramsch D.M., Sevanian A. et al. (1994), *J. Lipid Res.*, **35**, 669-677.
23. Havel R. G., Eder H. and Bragdon J. *J. Clin. Invest.*, (1955), **34**, 1345-1353.
24. Ushiyama M. and Michara M. (1978), *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278.
25. Franzini E., Sellak H., Marquetty C. et al. (1996), *Free Rad. Biol. Med.*, **21**, 1, 15-23.
26. Nawroth P. P., Bank I., Handley D. et al. (1986), *J. Exp. Med.*, **163**, 6, 1363-1375.
27. Spyridopoulos I., Brogi E., Kearney M. et al. (1997), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 1321-1330.
28. Delius R. E. and Hinshaw D. B. J. (1991), *Surg. Res.*, **50**, 4, 314-322.
29. Биленко М.В. (1989). Ишемические и реперфузионные повреждения органов. Медицина, Москва.
30. Bhat G. B., Tinsley S. B., Tolson J. K. et al. (1992), *J. Cell. Physiol.*, **151**, 2, 228-238.
31. Li R. K., Shaikh N., Weisel R. et al. (1992), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **24**, 6, 595-604.
32. Varani J., Phan S. H., Gibbs D. F. et al. (1990), *Lab. Invest.*, **63**, 5, 683-689.
33. Whorton A.R., Montgomery M.E. and Kent R.S. (1985), *J. Clin. Invest.*, **76**, 295-302.
34. Polunovsky V.A., Wendt C.H., Ingbar D.H. et al. (1994), *Exp. Cell. Res.*, **214**, 584-594.
35. Hiraishi H., Ferano A., Razandi M. et al. (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**, 14812-14817.
36. Lennon S. V., Martin S. J. and Cotter T. G. (1991), *Cell. Prolif.*, **24**, 203-214.
37. Соловьев А.С., Коробко В.Г., Шингарова Л.Н. и др. (1995), *Биохимия*, **60**, 1283-1292.
38. Биленко М.В., Вахрушева Т.В. и Федосова С.В. БЭБиМ, в печати.
39. Frolkis I., Gurevitch J., Yuhas Y. (1997), XVIII Eur. Section Meeting of the ISHR. Abstracts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 5, Sa1, A107.
40. Nowak T.S., Fried R. L., Lust W.D. and Passonneau J.V. (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 487-494.

COMPARATIVE EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE AND TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA ON NONISCHEMIC AND ISCHEMIC ENDOTHELIAL CELLS

M. V. BILENKO, V. G. LADYGINA, S. V. FEDOSOVA.

Institute of Biomedical Chemistry RAMS. Moscow, 119832, Pogodinskaya Str., 10.
Fax: 7 (095) 245-08-57.

We studied cytotoxic effects (CTE) induced in confluent cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by initiators of free-radical reactions (FRR): H_2O_2 (10^{-6} — 10^{-9} M), recombinant human tumor necrosis factor- α (TNF- α , 0,05—100 ng/ml), and a combination of TNF- α with low-density lipoproteins (LDL, 100 μ g/ml). HUVEC were incubated with these substances for 6 or 24 h in parallel tests performed under aerobic (CO_2 -incubator) and ischemic conditions (a mixture of 95% N_2 + 5% CO_2 in RPMI-1640 medium containing no substrate additives, growth factor or protein). HUVEC viability was determined by counting cells adherent to the bottom of wells after 24 h of reincubation under aerobic conditions in the growth medium (Plating Efficiency Index). The data showed that: 1) CTE of these compounds were dose-dependent (H_2O_2 and TNF- α) and time-dependent (TNF- α); 2) CTE of FRR initiators and CTE of ischemia were synergistic, that is, their combination produced a greater decrease HUVEC viability than any substance examined or ischemia alone; 3) CTE of TNF- α observed in experiments in substrate-deficient, protein-free medium was considerably stronger than in the growth medium; 4) a combination of TNF- α and LDL caused a stronger CTE on HUVEC than either factor alone, and this synergism was more pronounced during incubation under ischemic conditions. Thus, the data indicate that FRR initiators and TNF- α + LDL particularly increase the severity of ischemic injuries of EC and therefore they can be factors which in hypercholesterolemic patients predispose vascular wall to atherosclerosis.

Key words: endothelial cells, ischemia, H_2O_2 , TNF- α , LDL.