

УДК ВМ 09-327

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО ФИБРИНОГЕНА НА АПОПТОЗ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

*А.В. Асейчев<sup>1\*</sup>, О.А. Азизова<sup>1</sup>, О.Н. Щегловитова<sup>2</sup>,  
Н.Н. Склянкина<sup>2</sup>, Г.Г. Борисенко<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное учреждение Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, ул. Малая Пироговская, дом 1а, 119435 Москва;

тел./факс: (499) 246-4401; эл. почта: info@ripcm.org

<sup>2</sup>ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН, ул. Гамалеи, дом 18, 123098 Москва; тел.: (499)1933001; факс: (499)1936183; эл. почта: info@gamaleya.ru

Окислительный стресс играет важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза. Фибриноген (ФБ), белок коагуляционного каскада плазмы, является независимым риск-фактором развития атеросклероза и имеет высокую предрасположенность к окислительным модификациям как при развитии окислительного стресса так и при различных патологических процессах. Поскольку нарушение функций эндотелия сосудов играет ключевую роль при атеросклерозе, постольку представляется интересным исследовать влияние ФБ-окс на эндотелиальные клетки кровеносных сосудов человека (ЭКЧ). В данной работе мы изучали воздействие окисленных и неокисленных форм фибриногена на развитие запрограммированной смерти ЭКЧ *in vitro* в ходе 24-х часовой инкубации в двух различных условиях: (1) при отсутствии ростовых факторов и низком содержании сыворотки (0,1%) (условия “голода”) и (2) в полной среде в присутствии 5% эмбриональной сыворотки человека. Проводилось параллельное определение 2-х маркеров апоптоза: экстернализация фосфатидилсерина на поверхности ЭКЧ и активность каспазы-3, а также анализ морфологии клеточных ядер. В условиях “голода”, при которых наблюдалась значительная гибель ЭКЧ и активация апоптоза, добавление неокисленного ФБ не только существенно улучшило выживаемость клеток, но и полностью ингибировало активность каспазы-3/7. В присутствии ФБ-окс наблюдалась в 1,5 раза большая каспазная активность, однако по-прежнему превалировал защитный эффект по отношению к ЭКЧ. В оптимальных условиях культивации добавление неокисленного ФБ снизило количество апоптотических клеток в три раза. Окисленный ФБ хоть и в меньшей степени, но также улучшал выживаемость клеток. Таким образом, ФБ способствовал выживанию ЭКЧ в стрессовых условиях (условиях “голода”), однако окисление ФБ снизило его антиапоптотическую функцию.

**Ключевые слова:** апоптоз, атеросклероз, эндотелиальные клетки, окислительный стресс, окисленный фибриноген.

**ВВЕДЕНИЕ.** Окислительный стресс принимает участие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза [1-3]. Развитие окислительного стресса связано с активацией внутриклеточных сигнальных путей активными формами кислорода и модифицированными липидами и белками [4, 5]. Показано, что при атеросклерозе окислительный стресс приводит к повреждению эндотелия, развитию воспалительных процессов, способствует миграции лейкоцитов и моноцитов, образованию пенных клеток, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, образованию бляшек.

Важная роль в этих процессах принадлежит окисленным липопротеинам [6]. Однако, окислительной модификации могут подвергаться и другие белки, в частности, фибриноген. Фибриноген является независимым риск-фактором развития атеросклероза и осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [7].

\* - адресат для переписки

## ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО ФИБРИНОГЕНА НА АПОПТОЗ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Известно, что прогрессирование атеросклеротической бляшки сопровождается накоплением в ней фибриногена и фибрина [8]. Также было показано, что фибриноген вызывает утолщение интимы сосудов, а его высокое содержание в плазме связано с увеличением тромбообразования, риском развития инсульта и инфаркта, риском возникновения осложнений после кардиохирургических операций [9].

Важно отметить, что фибриноген является белком, который наиболее чувствителен к действию оксидативного стресса [10]. Поскольку развитие атеросклероза тесно связано с окислением липидов, белков и нуклеиновых кислот, постольку нами было выдвинуто предположение, что окисленный фибриноген, наряду с окисленными липопротеинами может появляться в плазме крови или в стенке кровеносных сосудов и способствовать патологическим процессам, наблюдаемым при атеросклерозе.

Ранее нами было показано, что окисленный фибриноген обладает высокой биологической активностью в отношении клеток эндотелия. Установлено, что в первичной культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека окисленный фибриноген индуцирует продукцию хемокина ИЛ-8 в 1,5-2 раза активнее, чем неокисленный фибриноген [11]. Также нами было обнаружено, что нативный и окисленный фибриноген индуцируют в клетках культуры эндотелия пупочной вены человека экспрессию молекул клеточной адгезии – Р-селектин и ICAM-1, при этом окисленные формы фибриногена вызывали более высокий уровень экспрессии этих молекул по сравнению с нативным белком [12].

Есть данные указывающие на то, что окисленный фибриноген может вызывать апоптоз эндотелиальных клеток [13], который, согласно данным литературы, является одной из причин образования тромба в случае острых сосудистых синдромов [14]. В связи с этим, целью данной работы являлось изучение влияния окисленных и неокисленных форм фибриногена на апоптоз эндотелиальных клеток кровеносных сосудов человека *in vitro*.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

**Реактивы.** Использовали кит для оценки апоптоза и для определения активности каспазы-3 с помощью Аннексин V и пропидиума йодида (Molecular probes, EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #2). Кит для определения концентрации белка (QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma).

Среда DMEM, физиологический раствор (PBS) и глутамин (“Панэко”, Москва). Стауроспорин и циклогексимид (“Сигма”, США).

**Культивирование клеток.** Эндотелиальные клетки (ЭК) были выделены из пупочной вены человека по методике [15]. Клетки выращивали в культуральных матрасах в среде 199 с 20 мМ HEPES, 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК), 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все “Gibco”, США) и 50 мкг/мл эндотелиального ростового фактора из человеческой нервной ткани. Культуральную среду меняли через день. Монослой первичной культуры ЭК трипсинизировали (0,05% трипсин + 0,02% ЭДТА, “Gibco”), пассировали на 6 луночные платы и использовали на 4 день. Монослойные культуры ЭК после контакта с фибриногеном в течение разного периода времени при 37°C промывали фосфатным буфером и диспергировали смесью трипсина и ЭДТА.

**Приготовление окисленного фибриногена.** Фибриноген окисляли согласно следующей процедуре. Лиофилизированный человеческий фибриноген (“Sigma”), взятый в концентрации 6 мг/мл растворяли в фосфатно-буферном изотоническом растворе хлорида натрия (pH=7,4). Окисление фибриногена вызывали с помощью добавления сульфата железа и перекиси водорода (50 мкМ  $\text{FeSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 100 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и инкубации в течении 1 часа при 37°C. Окисление останавливали с помощью добавки десферала (дефероксамин мезилат, “Sigma”) в конечной концентрации 2,0 мМ, после чего проводили однократный диализ препарата окисленного фибриногена в течение 4 часов против 3,0 л того же буферно-солевого раствора при комнатной температуре.

*Оценка апоптоза методом проточной цитометрии.* Эндотелиальные клетки человека (ЭКЧ) отмывали от культуральной среды PBS, снимали с подложки с помощью трипсина, центрифугировали (800 g, 5 мин), отмывали холодным PBS и ресуспендировали в 0,1 мл реакционного буфера, содержащего флуоресцентные красители Аннексин V-FITC и пропидий йодид, в количестве  $5 \times 10^5$  клеток. После 15 минутной инкубации образец разводили добавлением 0,4 мл реакционного буфера без красителей. Анализ клеток проводился с помощью проточной цитометрии на приборе Coulter Epix XL ("Beckman Coulter", США). Флуоресценция возбуждалась аргоновым лазером (488 нм) и детектировалась через фильтры 505-545 и 650-725 нм для Аннексина V-FITC и пропидия йодида соответственно.

*Оценка активности каспаз 3/7.* Активность каспазы-3 определяли в лизатах эндотелиальных клеток с помощью флуоресцентной детекции накопления флуорофора R110, который образуется при гидролизе каспазой-3 субстрата Z-DEVD-R110. Перед приготовлением лизата эндотелиальные клетки 3 раза отмывали PBS, затем к клеткам добавляли 125 мкл охлаждённого до 0°C лизирующего буфера и замораживали на 2 часа. После разморозки лизаты центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин в центрифуге Эппендорф с охлаждением при 4°C. Часть супернатанта (100 мкл) использовали для определения активности каспазы-3, а другую часть (20 мкл) супернатанта использовали для определения концентрации белка в лизате клеток. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью плашечного флуоресцентного ридера ФФМ-1 ("Картек", Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли при  $485 \pm 10$  нм и испускание флуоресценции учитывали при  $535 \pm 12,5$  нм. Концентрацию белка определяли с помощью BCA теста, используя кит (QuantiPro™BCA Assay Kit, "Sigma") согласно руководству производителя.

Активность каспазы-3 выражали в относительных единицах, и считали как отношение интенсивности флуоресценции R110 после 60 минут инкубации субстрата Z-DEVD-R110 с лизатами эндотелиальных клеток к концентрации белка в этих лизатах, выраженной в мкг/мл.

Значения измеряемых величин представляли в виде средних арифметических величин из  $n$  ( $n=5$ ) независимых экспериментов и стандартного отклонения, в качестве которого использовалась стандартная ошибка.

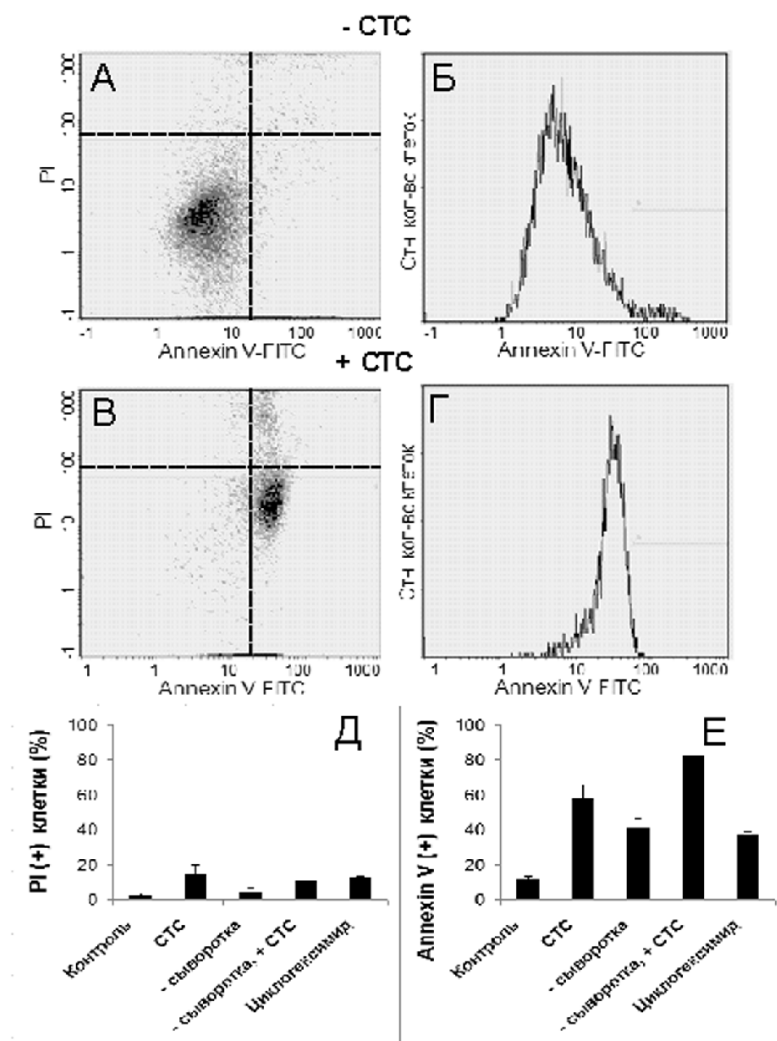
**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Воздействие окисленного фибриногена (ФБ-окс) на ЭКЧ проводилось по параллельному определению 2-х маркёров апоптоза: экстернализация фосфатидилсерина на поверхности ЭКЧ и активность каспазы-3 в лизатах ЭКЧ.

*Экстернализация фосфатидилсерина на поверхности ЭКЧ* – это один из высокопроизводительных методов оценки количества апоптотических клеток. Плазматическая мембрана живых клеток ассиметрична по распределению фосфатидилсерина – 95-99% этого липида находится в её внутреннем монослое. Во время апоптоза происходит экстернализация липида [16]. Помимо этого, плазматическая мембрана апоптотических клеток долгое время сохраняет свою целостность, что и отличает этот тип клеточной смерти от некроза [17]. Аннексин V связывается с высокой аффинностью и специфичностью с фосфатидилсерином, и таким образом окрашивает апоптотические клетки с целостной мембраной и клетки с повреждённой мембраной (поздний апоптоз и некроз). Пропидий йодид является хроматиновым красителем, проникающим только в клетки с повреждённой мембраной, т.е. окрашивающим поздние апоптотические и некротические клетки. Таким образом, двойная окраска Аннексином V-FITC и пропидием йодидом позволяет дискриминировать живые, апоптотические и некротические клетки [18].

Нами был проведён предварительный анализ нескольких стрессовых воздействий на ЭКЧ, включая циклогексимид (ингибитор белкового синтеза), стауроспорин (один из традиционных инициаторов митохондриально зависимого апоптоза) и культивирование в среде с обеднённой сывороткой (0,1%) без факторов роста.

## ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО ФИБРИНОГЕНА НА АПОПТОЗ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Гистограммы распределения клеток по флуоресценции Аннексина V-FITC, полученные методом проточной цитометрии, показывают отчётливое усиление окраски после обработки стауроспорином (рис. 1Б,Г). Это также видно и на двумерных распределениях клеток по флуоресценции Аннексина V-FITC и пропидия йодида (рис. 1А,В). Мембрана апоптотических клеток становится несколько более проницаемой для пропидия йодида (рис. 1В, правый нижний квадрат), однако флуоресценция клеток с повреждённой мембраной увеличивается существенно больше – на 2-3 порядка (рис. 1В, правый верхний квадрат). Таким образом, отчётливо видны три популяции: живые, апоптотические и некротические/поздние апоптотические клетки.



**Рисунок 1.**

Цитотоксический анализ нескольких стрессовых воздействий на ЭКЧ методом проточной цитометрии.

А,В - двумерные распределения клеток по флуоресцентной окраске Аннексином V-FITC и пропидием йодидом (PI); Б,Г - Гистограммы распределения клеток по флуоресценции Аннексина V-FITC; А,Б - нативные ЭКЧ; В,Г - апоптоз индуцирован стауроспорином (СТС); Д,Е - количественный анализ некротических клеток (окрашены PI, "PI (+)") и апоптотических клеток (окрашены Аннексином V-FITC, "Аннексин V (+)"). Нативные клетки ("контроль") инкубировались в присутствии СТС, циклогексимида, или в условиях голода и отсутствия ростовых факторов (" - сыворотка").

Количественный анализ показал, что все три воздействия индуцируют смерть клеток с участием апоптотического пути. Относительный вклад этого механизма однако различается: в условиях голода он играет наибольшую роль, а при обработке циклогексимидом – наименьшую (рис. 1 Д,Е).

Влияние фибриногена на ЭКЧ изучалось в ходе 24-х часовой инкубации в двух принципиально различных условиях: (1) при отсутствии ростовых факторов и низком содержании сыворотки (0,1%), (2) в полной среде в присутствии СЭЧ 5%. Фибриноген (ФБ) добавляли в инкубационную среду в PBS в физиологических концентрациях 3 и 6 мг/мл.

По данным *проточной цитометрии* инкубация в присутствии сыворотки 0,1% вызвала значительный токсический эффект (рис. 2А). Неожиданно выяснилось, что добавление в эту систему фибриногена почти полностью блокирует апоптоз, вызванный отсутствием ростовых и питательных факторов. В присутствии ФБ-окс наблюдалась небольшая смертность (в 1,5 раз выше, по сравнению с ФБ в условиях голода и нативными клетками в полной среде), однако доминировал защитный эффект. Добавление в среду железа в количестве используемом для окисления ФБ не повлияло на выживаемость клеток и тем самым показало, что причиной апоптоза явилось отсутствие ростовых факторов и сыворотки, а не оксидативный стресс, связанный со следовыми количествами металла, который мог попасть в среду вместе с окисленным ФБ.

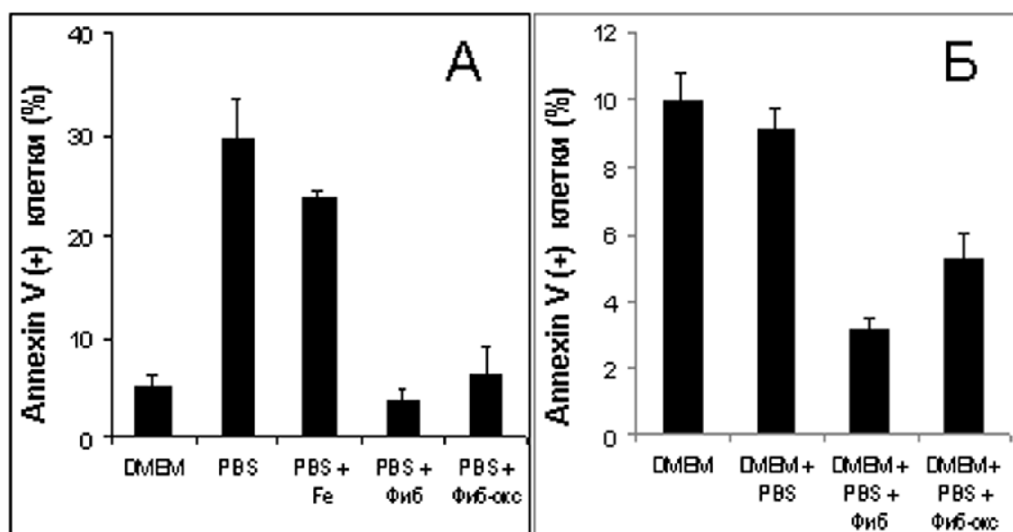


Рисунок 2.

Анализ влияния нативного и окисленного фибриногена на запрограммированную смерть ЭКЧ.

Количество клеток окрашенных Annexin V-FITC ("Annexin V (+)") оценивалось методом проточной цитометрии после 24 часов инкубации ЭКЧ в отсутствии фибриногена (в среде DMEM, в PBS, в PBS с добавлением ионов Fe) и с окисленным или неокисленным фибриногеном (3 мг/мл).

А - при отсутствии ростовых факторов и низком содержании сыворотки (0,1%),

Б - в полной среде в присутствии СЭЧ 5%.

Инкубация в присутствии сыворотки 5% и PBS (50%) не оказала значительного влияния на состояние клеток по сравнению со стандартными условиями культивирования (сыворотка 10%, полная DMEM) (рис. 2Б). Однако даже в этих условиях добавление ФБ снижало количество апоптотических клеток в три раза. ФБ-окс хоть и в меньшей степени, но также улучшал выживаемость клеток.



При определении активности каспазы-3 в лизатах ЭКЧ (рис. 3) наблюдались сходные закономерности.

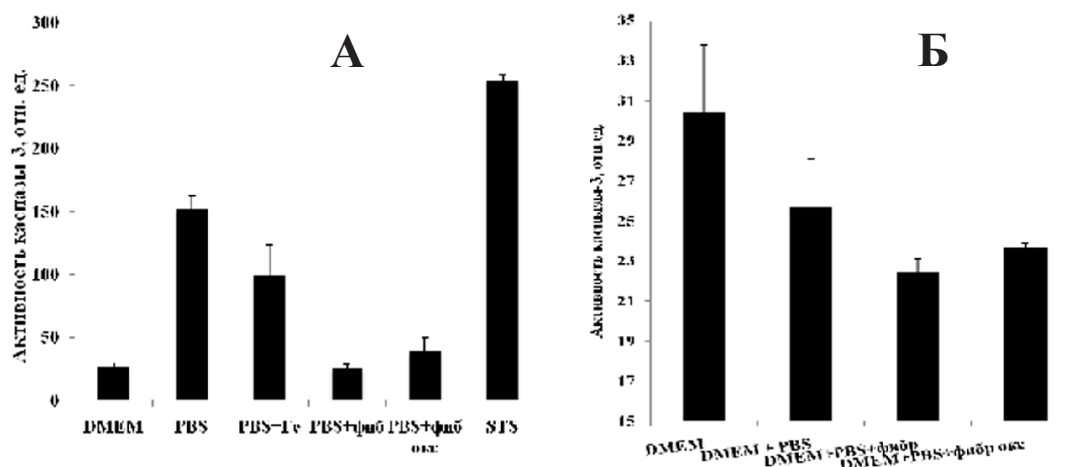


Рисунок 3.

Уровень активности каспазы-3 в лизатах ЭКЧ после 24 часов инкубации клеток в отсутствии фибриногена (в среде DMEM, в PBS, в PBS с добавлением ионов Fe) и с окисленным или неокисленным фибриногеном. (А) при отсутствии ростовых факторов и низком содержании сыворотки (0,1%), (Б) в полной среде в присутствии СЭЧ 5%.

Инкубация ЭКЧ в присутствии сыворотки 0,1% также приводила к резкому повышению уровня активности каспазы-3 (рис. 3А), а добавление в среду железа не влияло на результат. Добавление фибриногена не только существенно улучшало выживаемость клеток, но и значительно ингибировало активность каспаз-3/7. В присутствии ФБ-окс наблюдалась небольшая каспазная активность (примерно в 1,5 раз выше, по сравнению с ФБ в условиях голода и нативными клетками в полной среде). Как и в случае неокисленного фибриногена здесь также наблюдался защитный эффект.

Каспазная активность при инкубации в присутствии сыворотки 5% и PBS (50%) была низкой, однако наблюдались те же закономерности, что и при анализе экстернализации фосфатидилсерина: ФБ и ФБ-окс вызывали достоверное снижение протеазной активности. Однако ингибирующий эффект ФБ был сильнее по сравнению с ФБ-окс (рис. 3Б).

В целом, анализ данных по пяти экспериментам показал, что в присутствии ФБ наблюдался очень небольшой процент апоптотических клеток, и что независимо от условий инкубации, апоптоз в присутствии ФБ-окс был на 40% выше по сравнению с ФБ. Этот результат был также подтвержден анализом морфологии ядер клеток, проведенной с помощью флуоресцентной микроскопии после окраски клеток хроматиновым реагентом DAPI. В присутствии обеих форм фибриногена число клеток с фрагментированными ядрами, характерными для апоптоза, было относительно низким (несколько процентов), но в присутствии ФБ-окс количество апоптотических клеток было в 2 раза выше, чем в присутствии ФБ (данные не показаны).

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Протеомные исследования профиля окисленных белков плазмы крови при различных патологических процессах показывают, что фибриноген является одним из белков наиболее сильно подверженных окислению [10, 13, 19]. В частности, повышение уровня ФБ-окс было обнаружено при заболеваниях сердца [13]. Недавно было показано, что фибриноген, окисленный в системе Фентона (пероксид водорода + ионы железа), обладает цитотоксическим действием на эндотелиальные клетки [13]. Учитывая тот факт,

что ФБ является риск-фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний, и что ФБ-окс индуцирует в ЭКЧ провоспалительные изменения [7-9, 11, 12], исследование механизмов цитотоксического действия ФБ-окс на эндотелиальные клетки представляется весьма актуальным.

В данной работе мы исследовали влияние ФБ и его окисленной формы на ЭКЧ с помощью нескольких методов измерения выживаемости клеток и экспрессии маркеров некроза и апоптоза.

После инкубации в присутствии ФБ было обнаружено небольшое количество апоптотических клеток (несколько процентов). ФБ-окс, полученный в ходе окисления ФБ в присутствии физиологических концентраций  $H_2O_2$ , индуцировал статистически достоверный, но низкий апоптоз по сравнению с нативным фибриногеном. Однако оказалось, что обе формы фибриногена обладают сильно выраженным антиапоптотическим действием. Так, через сутки инкубации в условиях голода (сыворотка 0,1%) и отсутствия ростовых факторов наблюдалась значительная активация каспаз-3/7 и гибель 25-30% клеток (рис. 2-3). Добавление в среду фибриногена (3 мг/мл) полностью блокировало развитие апоптоза. Более того, даже в условиях питательного достатка (5% сыворотки) и относительно хорошего состояния клеток (5-10% апоптотических клеток, низкая активность каспаз-3/7), ФБ по-прежнему заметно снижал их смертность.

Очевидно, фибриноген нельзя рассматривать лишь “как пищевой” ресурс для клеток, так как его содержание составляло всего 0,1-0,2% в расчёте на белок, что почти на два порядка меньше сывороточных белков, используемых для культивации клеток в стандартных условиях. Следовательно, на поверхности ЭКЧ есть специфические рецепторы для ФБ, через которые ФБ может участвовать в регуляции внутриклеточных сигнальных путей, связанных с регуляцией апоптоза. Очевидно, ФБ способен подавлять апоптоз ЭКЧ, вызванный голодом, и выполнять функции ростового фактора.

Действительно, согласно литературным данным, фибриноген может выполнять несколько функций по отношению к эндотелиальным клеткам, среди которых: обеспечение адгезии клеток в местах повреждения сосудов, индукция взаимодействия ЭКЧ с другими клетками крови и, самое главное, регулирование выживаемости и пролиферации ЭКЧ. Так, эндотелиальные клетки взаимодействуют с фибриногеном в физиологических условиях и при повреждении сосудов, когда фибрин формирует начальный матрикс, необходимый для организации ЭКЧ и их роста. Взаимодействие ЭКЧ с фибриногеном опосредовано интегриновыми рецепторами  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_5\beta_1$  расположенными на поверхности клеток [20-22]. Данное взаимодействие обеспечивает прикрепление клеток к фибриногену, индуцирует их миграцию и пролиферацию, тем самым участвуя в формировании ангиогенного ответа [20-22].

Установлено, что фибриноген способствует адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и трансэндотелиальной миграции в сайтах воспаления, выступая в качестве “мостиковой молекулы”. Белок связывается с молекулой клеточной адгезии ICAM-1 на эндотелиальной клетке и интегрином MAC-1 на лейкоците [23]. Адгезия активированных тромбоцитов к эндотелиальным клеткам также опосредована “мостиковой” функцией фибриногена; в этом взаимодействии участвуют ICAM-1 на эндотелиальной клетке и интегрин  $\alpha_{IIb}\beta_3$  на тромбоците [24].

Наконец, было показано, что фибриноген может способствовать выживанию клеток. Оказалось, что фибриноген связывается с высокой аффинностью с фактором роста фибробластов-2 (один из факторов, стимулирующих пролиферацию ЭКЧ) [25]. Фибриноген потенцирует способность фактора роста фибробластов-2 стимулировать пролиферацию ЭКЧ и предотвращает апоптоз клеток в условиях отсутствия ростовых факторов [26]. Более того, было установлено, что взаимодействие фибриногена с ICAM-1 предотвращает апоптоз ЭКЧ, вызванный TNF- $\alpha$  [27].

В данном исследовании было показано, что выживаемость клеток в присутствии ФБ-окс была ниже по сравнению с ФБ как в условиях голода, так и в присутствии 5% сыворотки с ростовыми факторами. Очевидно, ФБ-окс представлен смесью нативного ФБ и его формами в разной степени окисления, поэтому данный результат может иметь несколько интерпретаций. Выживаемость клеток в присутствии ФБ-окс может определяться снижением нативного ФБ (1), прямым но слабым токсическим эффектом ФБ-окс (2), или снижением защитных свойств ФБ-окс по сравнению с ФБ (3). Учитывая, что фибриноген-зависимое выживание ЭКЧ опосредовано лиганд-рецепторными взаимодействиями, можно полагать, что окисление ФБ индуцирует конформационные изменения, модулирующие взаимодействие белка с рецепторами на поверхности клеток и снижающие его антиапоптотическую активность.

Полученные нами результаты имеют расхождение с ранее полученными в работе Banfi с соавт. в работе [13], где добавление окисленного фибриногена к эндотелиальным клеткам вызывало цитотоксический эффект. Мы полагаем, что цитотоксический эффект окисленного ФБ, показанный Banfi et al. был связан с моделированием окислительного стресса в условиях окисления далёких от физиологических с использованием высоких концентраций  $H_2O_2$  и ионов железа (1 мМ каждого) в присутствии низких концентраций белка (по сравнению с плазмой крови) [13]. Длительное (16 часовое) окисление ФБ в этих условиях могло вызвать образование многочисленных продуктов, не имеющих место в физиологических условиях. Добавление окисленного ФБ к клеткам вместе с перекисью водорода и ионами железа, ещё больше усложнило эту искусственную систему.

Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что ФБ и ФБ-окс способствуют выживанию эндотелиальных клеток как в стрессовых, так и в стандартных условиях культивирования. Однако, ФБ-окс обладает сниженным антиапоптотическим действием по сравнению с неокисленным фибриногеном.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Beal M.F. (2002) *Free Radic. Biol. Med.*, **32**(9), 797-803.
2. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. (1995) *Circulation*, **91**, 2488–2496.
3. Griending K.K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2175-2183.
4. Wang Z., Nicholls S.J., Rodriguez E.R., Kummu O., Hörkö S., Barnard J., Reynolds W.F., Topol E.J., DiDonato J.A., Hazen S.L. (2007) *Nat. Med.*, **13**, 1176-1184.
5. Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A., Kapralov O., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Stoyanovsky D.A., Wipf P., Kochanek P.M., Greenberger J.S., Pitt B., Shvedova A.A., Borisenko G.G. (2009) *Free Rad. Biol. Med.*, **46**, 1439-1453.
6. Witztum J.L. (1993) *Br. Heart J.*, **69**, S12–S18.
7. Koenig W. (1999) *Curr. Cardiol. Rep.*, **1**(2), 112-118.
8. Spronk H.M.H., van der Voort D., ten Cate H. (2004) *Thrombosis J.*, **2**, 12.
9. Levenson J., Giral P., Razavian M., Gariepy J., Simon A. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**(9), 1263-1268.
10. Shacter E., Williams J.A., Lim M., Levine R.L. (1994) *Free Rad. Biol. Med.*, **17**(5), 429-437.
11. Азизова О.А., Макшанина Е.В., Романов Ю.А., Асейчев А.В., Щегловитова О.Н. (2004) *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **137**(4), 358-360.
12. Щегловитова О.Н., Азизова О.А., Романов Ю.А., Асейчев А.В., Литвина М.М., Полосухина Е.Р., Миронченкова Е.В. (2006) *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **142**(9), 277-281.
13. Banfi C., Brioschi M., Barcella S., Veglia F., Biglioli P., Tremoli E., Agostoni P.G. (2008) *European Journal of Heart Failure*, **10**, 244–251.



14. Davignon J., Ganz P. (2004) *Circulation*, **109**, III-27-III-32.
15. Scheglovitova O.N., Romanov Yu.A., Maksianina E.V., Kabaeva N.V., Pronin A.G. (2001) *Russ. J. Immunol.*, **6**, 367-376.
16. Bratton D.L., Dreyer E., Kailey J.M., Fadok V.A., Clay K.L., Henson P.M. (1992) *J. Immunol.*, **148**, 514-523.
17. Danial N.N., Korsmeyer S.J. (2004) *Cell*, **116**, 205-219.
18. Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., Van Schie R.C., LaFace D.M., Green D.R. (1995) *J. Exp. Med.*, **182**, 1545-1556.
19. Choi J., Malakowsky C.A., Talent J.M., Conrad C.C., Gracy R.W. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1566-1570.
20. Cheres D.A., Berliner S.A., Vicente V., Ruggeri Z.M. (1989) *Cell*, **58**, 945-953.
21. Suehiro K., Gailit J., Plow E.F. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 5360-5366.
22. Smith J.W., Cheres D.A. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2168-2172.
23. Languino L.R., Plescia J., Duperray A., Brian A.A., Plow E.F., Geltosky J.E., Altieri D.C. (1993) *Cell*, **73**, 1423-1434.
24. Tsakadze N.L., Zhao Z., D'Souza S.E. (2002) *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 101-108.
25. Sahni A., Odrlic T., Francis C.W. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 7554-7559.
26. Sahni A., Sporn L.A., Francis C.W. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14936-14941.
27. Pluskota E., D'Souza S.E. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4693-4704.

Поступила: 15. 12. 2009.

## THE INFLUENCE OF OXIDIZED FIBRINOGEN ON APOPTOSIS OF ENDOTHELIAL CELLS

A.V. Aseychev<sup>1</sup>, O.A. Azizova<sup>1</sup>, O.N. Scheglovitova<sup>2</sup>, E.R. Polosukhina<sup>2</sup>, G.G. Borisenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physicochemical Medicine, Federal Medico-Biological Agency, M. Pirogovskaya st., 1a, Moscow, 119435 Russia; tel./fax: +7(499) 246-4401; e-mail: info@ripcm.org

<sup>2</sup>Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Gamaleya st., 18, Moscow, 123098 Russia; tel.: +7(499)1933001; fax: +7(499)1936183; e-mail: info@gamaleya.ru

Oxidative stress plays an important role in cardio-vascular diseases and atherosclerosis. Fibrinogen (FB), plasma coagulation protein, is a risk factor of atherosclerosis. Importantly, it can be readily oxidized during oxidative stress and in pathological conditions. FB can promote angiogenesis by supporting migration and proliferation of endothelial cells. On the other hand, recent reports demonstrated cytotoxicity of oxidized fibrinogen (oxFB). Endothelial dysfunction plays a critical role in the atherosclerosis development, therefore it is important to understand the effect of oxFB on human endothelial cells (hEC), and the mechanism of the cell death. Here, we studied influence of oxFB on hEC during 24 h incubation in two conditions: (1) at low serum level (0.1%) and in the absence of growth factors ("starvation"); (2) in full medium (5% FBS) with growth factor supplement. Apoptosis was evaluated using analysis of nuclear morphology, phosphatidylserine externalization on hEC surface and caspase-3 activation. In starvation, we observed significant cell death via apoptosis. FB prevented starvation-induced cell death and caspase activation. Caspase activity in the presence of oxFB was 1.5 times higher as compared to FB, yet oxFB demonstrated significant cell protection during stress. Similarly, in optimal cultivation conditions FB decreased the rate of apoptosis by three times, while oxFB supported cell viability to the lesser extent. Thus, FB can protect hEC in stress conditions (in starvation); oxidative modification of FB diminishes its antiapoptotic properties.

**Key words:** apoptosis, atherosclerosis, endothelial cells, oxidative stress, oxidized fibrinogen.