

© Р.Пино, Д. Лайлс

**ВЛИЯНИЕ АКТИВНОСТИ СЕМИКАРБАЗИД-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ  
АМИНОКСИДАЗЫ И КЛЕТОЧНОГО ГЛУТАТИОНА НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ  
ЭФФЕКТЫ АЛЛИЛАМИНА, АКРОЛЕИНА, И ФОРМАЛЬДЕГИДА В  
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

Р.ПИНО, Д. ЛАЙЛС

Кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Университет Данди, госпиталь  
Найнвеллс, Данди, Великобритания

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, University of Dundee, Ninewells Hospital  
and Medical School, Dundee DD1 9SY, UK

Способность аллиламина (AA) вызывать сосудистые нарушения, напоминающие атеросклеротическую болезнь у животных, связывают с метаболизмом AA до токсического альдегида акролеина (ACR), катализируемым семикарбазид-чувствительной аминоксидазой (SSAO), которая обнаружена в плазме крови и гладкой мускулатуре сосудов. В настоящей работе мы исследовали цитотоксичность AA и ACR на культивируемых клетках пупочной вены человека (HUVEC). После 20-часовой обработки 50 мкМ AA не влиял, а 100 мкМ AA умеренно понижал жизнеспособность. Однако обе концентрации AA вызывали выраженную гибель клеток, если HUVEC инкубировали с гомогенатами пупочной артерии человека, который служил источником SSAO. Цитотоксический эффект 50 мкМ AA не изменялся при инкубации с ингибитором MAO паргилином (100 мкМ), но полностью предупреждался 100 мкМ семикарбазидом (ингибитор SSAO) и пропаргиламином (ингибитор MAO и SSAO). ACR в концентрациях 50 и 100 мкМ оказывал сильное цитотоксическое действие, но был малоэффективен в концентрациях 5 и 10 мкМ. Поскольку SSAO может также метаболизировать биогенный алифатический амин - метиламин до формальдегида (FA), были также изучены эффекты последнего на HUVEC. 50 мкМ FA незначительно влиял на жизнеспособность HUVEC, а 200 мкМ FA вызывал небольшое но статистически значимое уменьшение жизнеспособности. Цитотоксичность 200 мкМ FA (но не 50 мкМ FA) резко возрастала на HUVEC, преинкубированных 24 часа с ингибитором синтеза глутатиона (GSH) D,L-бутионин сульфоксимином (200 мкМ). Эти результаты предполагают, что целостность эндотелия или функционирование в кровеносных сосудах могут изменяться под действием этих алифатических альдегидов, присутствующих в качестве загрязнителей окружающей среды, пищевых примесей, а также возможных продуктов метаболических путей, в том числе и тех, которые вовлекают SSAO на биогенные и ксенобиотические алифатические амины. Наличие GSH-зависимых механизмов для метаболизма этих альдегидов может иметь важное защитное влияние.

*Принятые сокращения:* BSO) D,L-бутионин-[S,R]-сульфоксимин; ECGS) ростовая добавка эндотелиальных клеток; FCS) foetal calf serum; GSH) восстановленный глутатион; HUVEC) эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells); MAO) моноаминоксидаза; MTT) 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид; M199) среда 199; SSAO) семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (semicarbazide-sensitive amine oxidase)

**Ключевые слова:** семикарбазид-чувствительная аминоксидаза, глутатион, цитотоксический эффект, аллиламин, акролеин, формальдегид, культивируемые клетки эндотелия человека.

**ВВЕДЕНИЕ.** Эндотелиальные клетки и продукты их секреции играют важную роль в регуляции нормального функционирования сосудов, участвуя в контроле вазомоторного тонуса, внутрисосудистой свертываемости, образования внеклеточного матрикса и пролиферации гладкомышечных клеток кровеносных сосудов. Они обеспечивают также важный барьер проницаемости, влияя на перенос в сосудистую стенку и окружающие ткани не только циркулирующих клеток иммунной системы во время воспалительных процессов, но также различных физиологических и ксенобиотических циркулирующих агентов. Следовательно, механизмы, вызывающие повреждение или дисфункцию эндотелия, могут участвовать в развитии многих сосудистых расстройств, включая атеросклероз [1].

Становится все более очевидным, что среди многочисленных гипотетических факторов предрасположенности к сосудистому заболеванию, экспозиция к определенным химикатам окружающей среды (в том числе во время профессиональной деятельности) может продуцировать патологические нарушения, которые избирательно происходят в тканях сердечно-сосудистой системы. Поэтому выяснение происхождения этой специфичности позволит предположить механизмы, по которым естественные компоненты организма и их метаболиты могут также участвовать или инициировать этот процесс [2]. Одним из таких экзогенных агентов является ненасыщенный алифатический амин - аллиламин. Как промышленный химикат он используется при вулканизации резины, а также в качестве предшественника для синтеза ряда веществ, включая некоторые фармацевтические препараты. Пероральное или внутривенное введение аллиламина в условиях эксперимента различным видам животных (собакам, кроликам, рогатому скоту или крысам) вызывает патологическое повреждение миокарда и сосудистой ткани, которое характеризуется областями некроза и инициацией пролиферативных нарушений гладкой мускулы, что особенно заметно в венечных артериях [3-6]. Эти нарушения могут быть индуцированы накоплением липидов, например, назначением диеты богатой холестерином [7]. Таким образом, индуцируемая аллиламином сердечно-сосудистая токсичность может проявлять патологические черты, сходные с таковыми при атеросклерозе у человека (см. обзор [8]). Поэтому недавние исследования были направлены на изучение возможных механизмов индуцированного аллиламином повреждения клеток.

“Пристрастие” аллиламиновой токсичности для сердечно-сосудистой системы связывают с биоактивацией этого амина до высокореактивного алифатического альдегида под действием семикарбазид-чувствительной аминоксидазы (SSAO, КФ 1.4.3.6), которая особенно активна в кровеносных сосудах [9-10]. Общие свойства тканевых SSAO плазмы крови, видовые различия в субстратной специфичности недавно обобщены в обзорах [11-12]. В сосудистой ткани SSAO является мембраносвязанным (по-видимому, плазмолемным) ферментом, преимущественно ассоциированным с гладкомышечными клетками. Характеристическое свойство тканевой (и плазменной) SSAO метаболизировать синтетический амин - бензиламин, - часто используют для изучения распределения и (суб)клеточной локализации этих ферментов, а их чувствительность к ингибированию семикарбазидом и рядом других соединений позволяет отличить их от других бензиламиноксиляющих аминоксидаз (особенно митохондриальной моноаминоксидазы, MAO, КФ 1.4.3.4). В работах нашей лаборатории показано, что такие эндогенные алифатические амины как метиламин и аминоацетон являются субстратами SSAO гомогенатов сосудов различных видов (включая человека), катализирующей их превращение в потенциально токсические альдегиды - формальдегид и метилглиоксаль, соответственно. Существующий в последнее время интерес к возможной токсичности этих альдегидов

обусловлен также их образованием в других метаболических путях и возможной экспозиции человека к этим агентам в окружающей среде [13-15].

Методы клеточных культур наглядно продемонстрировали летальные эффекты аллиламина для гладкомышечных и эндотелиальных клеток, для кардиомиоцитов и фибробластов. Некоторые исследования показали также, что ингибиторы SSAO ослабляли или даже предупреждали повреждение клеток. Это свидетельствует в пользу того, что метаболизм аллиламина до акролеина осуществляет SSAO, экспрессируемая этими клетками и/или SSAO плазмы, присутствующей в добавках плазмы крови быка к среде культивирования клеток [16-19]. Кроме того, образование акролеина из аллиламина было прямо продемонстрировано в гомогенатах культивируемых гладкомышечных (свинья, крыса) и эндотелиальных (крыса) клеток [9, 18]. Окислительное дезаминирование аллиламина (и других аминов), катализируемое SSAO генерирует  $H_2O_2$  - другой потенциально токсический метаболит и было показано, что добавление каталазы к среде культивирования для ускорения деградации  $H_2O_2$ , частично предупреждало токсичность аллиламина в культуре клеток аорты и эндотелия [18].

Акролеин сам по себе встречается в окружающей среде. Он обнаружен в табачном дыму, выхлопных газах автомобиля и в других продуктах горения [20], а также является метаболитом противоракового препарата циклофосфида [21] и продуктом метаболизма эндогенных полиаминов [22]. Инактивация акролеина включает его конъюгацию с восстановленным глутатионом (GSH) и это может привести к истощению клеточного GSH, что и наблюдали в гладкомышечных клетках, метаболизирующих аллиламин до акролеина при участии SSAO [23]. Основное значение GSH в метаболизме различных ксенобиотиков и окислителей ( $H_2O_2$ , например) под действием GSH S-трансфераз и пероксидаз, соответственно, хорошо известно и любое истощение GSH может ослаблять устойчивость клеток к различным токсикологическим ударам [24]. В этой связи нами показано, что обработка гладкомышечных клеток D,L-бутионин-[S, R]-сульфоксимином (BSO) - ингибитором синтеза глутатиона, может потенцировать индуцированную акролеином цитотоксичность, возникающую в ходе катализируемого SSAO метаболизма аллиламина [25].

Для дальнейшего уяснения потенциала эндотелиальных клеток, являющихся мишенью васкулотоксических эффектов алифатических аминов и альдегидов окружающей среды и физиологического происхождения, в настоящей работе исследованы эффекты влияния аллиламина на жизнеспособность эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Поскольку HUVEC сами по себе SSAO в культуре не экспрессируют [26] мы добавляли препараты гомогенатов пупочной артерии человека к этим культурам в качестве источника сосудистой SSAO [27] для того, чтобы определить может ли фермент человека метаболизировать аллиламин с цитотоксическими последствиями. Этот подход использовали ранее Yu and Zuo [26] для изучения эффектов катализируемого SSAO превращения метиламина до формальдегида на жизнеспособность HUVEC. В настоящем исследовании мы также сопоставили прямые цитотоксические эффекты акролеина и формальдегида на HUVEC, а с формальдегидом мы исследовали может ли истощение GSH под действием BSO модифицировать наблюдаемые цитотоксические эффекты. Некоторые из этих результатов были предметами предварительных сообщений [28, 29].

**МЕТОДИКА.** *Материалы.* Коллагеназа (*C. histolyticum*) получена от Boehringer-Mannheim GmbH (Lewes, U.K.) Фетальная сыворотка телят (FCS), среда 199 (M199) с или без фенолового красного, антибиотики, L-глутамин и амфотерицин В получены от Gibco BRL (Paisley, UK). Изопропанол приобретен у BDH Laboratory Suppliers (Poole, U.K.). Аллиламин (основание) и пропаргиламин получены от Aldrich (Gillingham, U.K.). Ростовая

авка эндотелиальных (ECGS, лиофиолизованный порошок гипофиза быка), антитела, арин сульфат, DL-бутионин-[S,R]-сульфоксимин (BSO), 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-бензилтетразолий бромид (MTT), паргилин, семикарбазид гидрохлорид, акролеин и формальдегид (37% раствор) были получены от Sigma Chemical Company (Poole, U.K.).

*Подготовка конфлуентных культур HUVEC.* HUVEC выделяли из пупочных канатиков по методу Gimbrone et al. [30]. Зажатые участки канатика (длиной 10 и более см) гнали из родильного блока (Maternity Unit, Ninewells Hospital) сразу после нормальных родов или кесаревых сечений. После удаления зажимов кровь вымывали из пупочной вены стерильной средой M199 при помощи шприца, соединенного с дозировочной иглой (для перорального введения крысам), которую вводили в просвет сосуда. Затем вену заполняли стерильным раствором коллагеназы, поступающим из шприцев (дозировочных игл, которыми канюлировали сосуд с каждого конца) и перевязывали артериальными зажимами. Канатик инкубировали 10-20 мин при 37°C в изотоническом (0,9%) физиологическом растворе и диссоциированные эндотелиальные клетки собирали, опустошая вену и промывая 10 мл M199, в стерильные центрифужные пробирки. Клетки осаждали центрифугированием (100 g, 10 мин) ресуспендировали в 6 мл ростовой среды и равномерно высеивали в 2 лунки (3,5 см в диаметре) шестилуночной культуральной плашки. Росточная среда содержала M199 (с феноловым красным) со следующими добавками (в скобках указаны концентрации исходных растворов), дающими конечные пропорции (v/v): 20% S, 4% L-глутамин (200 mM водный раствор), 2% амфотерицин (5 мкг/мл), 2% пенициллин (100 ед/мл) со стрептомицином (100 мкг/мл) в воде, 0,1% ECGS (4 мг/мл) и 0,1% гепарин сульфат (100 мг/мл). Каждый из вышеперечисленных растворов готовили на стерильном физиологическом растворе.

HUVEC достигали конфлуентной стадии в первичной культуре обычно за одну неделю и демонстрировали типичную монослойную ("cobblestone") морфологию. Затем их идентифицировали как эндотелиальные клетки по позитивному иммунофлуоресцентному окрашиванию после обработки клеток сначала кроличьими антителами против фактора фибриногена человека, а затем противокроличьим IgG козы меченым флуоресцеином изотиоцианатом.

Для последующего культивирования конфлуентные клетки осторожно удаляли из культуральных лунок, используя скребок для клеток, пассировали в соотношении 1:3 к новым лункам в следующие шестилуночные плашки. Цитотоксичность определяли на конфлуентных клетках в этих плашках на втором или третьем пассаже.

*Подготовка гомогенатов пупочной артерии человека.* Наружные поверхности пупочных канатиков и анатомические инструменты промывали этанолом и около 250 мг ткани иссекали из пупочных канатиков в условиях стерильного потока воздуха. Ткань мелко измельчали, промывали в стерильном физиологическом растворе и затем гомогенизировали при соотношении 1:40 (г/мл) в 0,01 M калий-фосфатном буфере pH 7,4 (гомогенизованном через 0,2 мкм фильтр), используя ручной конический притерный стальной гомогенизатор, предварительно промытый и высушенный в этаноле. Конечный гомогенат переносили в стерильные центрифужные пробирки, центрифугировали при 600 g 5 мин и использовали супернатант в качестве источника SSAO в исследовании цитотоксичности.

*Инкубация культур с потенциальными цитотоксическими агентами.* Подготовленные исходные водные растворы аллиламина (50 mM), акролеина (50 mM) и формалиновый раствор формальдегида (12,3 M) разводили до выбранных конечных концентраций в среде, состоящей из M199 (без фенолового красного) с 5% FCS и

стандартных соотношений глутамин, антибиотиков и амфотерицина (см. выше), но без ECGS и гепарина. В некоторых экспериментах по изучению действия ингибиторов аминоксидаз на цитотоксические эффекты аллиламина, начальные 10 мМ водные растворы этих веществ (паргилин, пропаргиламин и семикарбазид) разводили до 100 мкМ в среде сохранения, содержащей (или не содержащей) 50 мкМ аллидамин. Все тест-растворы перед добавлением к культурам стерилизовали, пропуская через 0,2 мкм фильтр. После соответствующего разведения ни один из вносимых растворов не превышал 0,2% (v/v) объема конечной среды инкубируемых клеток. В экспериментах по определению эффектов истощения GSH на токсичность формальдегида некоторые лунки с HUVEC обрабатывали 200 мкМ BSO в среде сохранения в течение 24 ч при 37°C до замены среды на растворы сред, содержащие альдегид. BSO также включали в эти растворы, когда их добавляли к предобработанным BSO клеткам. В каждой культуре лунки, содержащие конфлюентные клетки, использовали в дубликатах для определенного исследуемого воздействия. После удаления ростовой среды и двукратного промывания клеточных слоев одной лишь средой исследуемые вещества добавляли к соответствующим лункам в 1 мл поддерживающей среды и плашки инкубировали 20 ч при 37°C. При исследовании эффектов гомогенатов пупочной артерии на токсичность аллиламина 100 мкл гомогенатов добавляли прямо к среде культивирования клеток. В контрольные образцы добавляли 100 мкл гомогенизационного буфера.

*Определение жизнеспособности клеток.* Метод Mosmann [31] основан на превращении МТТ в темносиний продукт формазан под действием митохондриальных дегидрогеназ живых клеток. После инкубации культур с тестируемыми агентами в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в среде М199 без фенолового красного) и плашки инкубировали 4 часа при 37°C. Для того, чтобы включить в определение жизнеспособности все плавающие и отделившиеся клетки, появившиеся после действия некоторых веществ, исследуемые растворы не удаляли перед добавлением МТТ. После инкубации к каждой лунке добавляли при энергичном перемешивании 2,2 мл 0,04 М HCl в изопропанол для растворения синих кристаллов формазана и поглощение конечных растворов измеряли при 570 нм на спектрофотометре Unicam (UV2) UV/VIS. Для оценки ферментативного превращения МТТ и HCl в изопропанол добавляли к 1 мл поддерживающей среды, не содержащей клеток. Величину поглощения этих проб (обычно 0,09-0,1 единицы поглощения) вычитали из всех результатов.

*Анализ данных.* Измерения поглощения представлены в виде средней  $\pm$  стандартная ошибка объединенных единичных значений каждой из "n" культур, где каждую культуру получали от различных канатиков. Эти единичные величины определяли как средние величины от двух лунок. Все полученные результаты первоначально анализировали тестом ANOVA (при  $p < 0,05$ ), исходя из гипотезы об отсутствии значимых изменений между группами. Затем, соответствующие множественные сравнения величин средних для выявления статистических различий между экспериментальными группами проводили с помощью теста Student-Newman-Keuls.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** *Влияние аллиламина на жизнеспособность HUVEC.* В предварительном исследовании обработка HUVEC 10 или 50 мкМ аллиламином незначительно влияла на жизнеспособность клеток по сравнению с контролем ( $n=3$  культуры, результаты не приведены).

В дальнейшем более детальное исследование проводили с 50 и 100 мкМ аллиламином. Каждую культуру инкубировали с амином в присутствии (или отсутствии) 100 мкл гомогената пупочной артерии в качестве потенциального источника активности SSAO

человека. Эти результаты приведены в таблице 1. Добавление гомогената (обозначение "гомогенатные контроли") незначительно влияло на жизнеспособность по сравнению с контролем. Более низкая концентрация аллиламина (50 мкМ) сама по себе не влияла на выживаемость клеток, но когда 50 мкМ аллиламин инкубировали с клетками в присутствии гомогената, жизнеспособность значительно и статистически значимо снижалась как при сравнении с каждой из контрольных групп, так и при сравнении с группой, обработанной только 50 мкМ аллиламином. Аналогичные результаты были получены при использовании 100 мкМ аллиламина. При этой концентрации сам аллиламин вызывал видимый и статистически значимый цитотоксический эффект. Однако, включение гомогената вместе со 100 мкМ аллиламином вызывало даже большую токсичность, которая значимо отличалась от таковой, наблюдаемой с одним 100 мкМ аллиламином. Таким образом, присутствие гомогената потенцировало токсичность обеих концентраций аллиламина в отношении HUVEC.

Таблица 1. Эффекты аллиламина (AA) и гомогената пупочной артерии человека на жизнеспособность HUVEC.

Экспериментальная группа	Поглощение	Значимость различий
a. Контроль	1,27 ± 0,04	d,e,f
b. Контроль гомогената	1,08 ± 0,04	d,e,f
c. 50 мкМ AA	1,33 ± 0,04	d,e,f
d. 50 мкМ AA + гомогенат	0,27 ± 0,10	a,b,c,e
e. 100 мкМ AA	0,70 ± 0,09	a,b,c,d,f
f. 100 мкМ AA + гомогенат	0,03 ± 0,01	a,b,c,e

Результаты представлены в виде средней ± стандартная ошибка определений четырех различных культур. Значимость различий во всех случаях  $p < 0,01$ .

*Эффекты ингибиторов аминоксидаз на вызванную аллиламином цитотоксичность.*

Эти эксперименты были проведены для того, чтобы исследовать зависят ли цитотоксические эффекты аллиламина, производимые в присутствии гомогената пупочной артерии, от метаболизма этого амина под действием ферментов MAO или SSAO, присутствующих в этой ткани [27]. Поэтому, цитотоксические эффекты 50 мкМ аллиламина с гомогенатом сравнивали в присутствии или отсутствии ингибиторов упомянутых ферментов. В этих экспериментах культуры (содержащие гомогенат) обрабатывали также только ингибиторами для выявления возможных прямых токсических эффектов на клетки. Результаты двух серий таких экспериментов приведены в таблице 2.

В первой серии экспериментов обработка аллиламином вызывала значительную потерю жизнеспособности HUVEC. Избирательный ингибитор MAO паргилин не влиял на этот эффект. Однако использование пропаргиламина в концентрации, ингибирующей и MAO и SSAO [32], предупреждало токсический эффект аллиламина и жизнеспособность не отличалась от контрольных проб. Ни один из использованных ингибиторов не изменял жизнеспособности HUVEC по сравнению с контролем.

Во второй серии экспериментов паргилин вновь не предупреждал токсичность аллиламина. Однако, в присутствии семикарбазида, используемого в качестве селективного ингибитора активности SSAO, цитотоксическое действие аллиламина не проявлялось. Как и в случае паргилина, паргилин прямо не влиял на жизнеспособность HUVEC.

Все эти приведенные результаты свидетельствуют что защита от токсического действия аллиламина в присутствии гомогената пупочной артерии достигается

ингибированием SSAO, но не MAO.

*Эффекты акролеина на жизнеспособность HUVEC.* Поскольку акролеин является алифатическим альдегидом - продуктом, который образуют аминоксидазы, катализируя метаболизм аллиламина, мы также исследовали цитотоксические эффекты акролеина на HUVEC. Данные таблицы 3 показывают, что при концентрации 5 и 10 мкМ акролеин не влияет на жизнеспособность клеток, а значительное и значимое снижение числа жизнеспособных клеток происходит при 50 и 100 мкМ акролеине. Эти результаты также свидетельствуют в пользу существования узкого диапазона увеличивающихся концентраций акролеина, при превышении которого незначительный эффект этого альдегида резко возрастает, вызывая гибель большого числа клеток.

Таблица 2. Эффекты ингибиторов аминоксидаз (100 мкМ) на вызванную 50 мкМ аллиламином токсичность HUVEC

Treatment group	Поглощение	Значимость различий
Эксперимент 1		
a. Контроль	0,76 ± 0,03	b,d
b. Аллиламин (AA)	0,14 ± 0,08	a,c,e,f
c. Паргилин	0,73 ± 0,02	b,d
d. AA + паргилин	0,14 ± 0,07	a,c,e,f
e. Пропаргиламин	0,70 ± 0,02	b,d
f. AA + propargylamine	0,66 ± 0,02	,d
Эксперимент 2:		
a. Контроль	0,87 ± 0,08	b,d
b. AA	0,05 ± 0,01	a,c,e,f
c. Паргилин	0,83 ± 0,08	b,d
d. AA + паргилин	0,05 ± 0,02	a,c,e,f
e. Семикарбазид	0,83 ± 0,05	b,d
f. AA + semicarbazide	0,86 ± 0,08	b,d

Все культуры содержали 100 мкл гомогената пупочной артерии. Представлены средние величины ± стандартная ошибка четырех (Эксперимент 1) или трех (Эксперимент 2) различных культур. Значимость различий во всех случаях  $p < 0,01$ .

Таблица 3. Эффекты акролеина на жизнеспособность HUVEC

Концентрация акролеина (мкМ)	Поглощение	Значимость различий:
a. 0 (контроль)	1,01 ± 0,02	d,e
b. 5	1,01 ± 0,04	d,e
c. 10	0,93 ± 0,04	d,e
d. 50	0,17 ± 0,13	a,b,c
e. 100	0,11 ± 0,08	a,b,c

Представлены средние величины ± стандартная ошибка определений 5 различных структур. Значимость различий во всех случаях  $p < 0,01$ .

*Эффект формальдегида на жизнеспособность HUVEC.* Для изучения возможных дозо-зависимых эффектов использовали 1, 10, 50, 100 и 200 мкМ формальдегид. Однако

только две самых высоких концентрации статистически значимо уменьшали число выживших клеток по сравнению с контролем (средняя  $\pm$  стандартная ошибка поглощения 3 культур: контроль  $0,70 \pm 0,06$ ; 100 мкМ формальдегид  $0,64 \pm 0,07$  ( $p < 0,05$  сравнение с контролем); 200 мкМ формальдегид  $0,30 \pm 0,07$  ( $p < 0,01$  сравнение с контролем). Эти результаты свидетельствуют что в сопоставимых условиях формальдегид аналогичных концентраций менее токсичен, чем акролеин.

В заключительной серии экспериментов исследовали влияние предобработки HUVEC BSO, который истощает клеточный GSH, снижая его синтез, на токсичность формальдегида в отношении HUVEC (табл. 4). BSO сам по себе незначительно изменял жизнеспособность клеток по сравнению с контролем. При сопоставлении двух использованных концентраций формальдегида оказалось, что 50 мкМ формальдегид не влиял, а 200 мкМ формальдегид вызывал небольшое, но статистически значимое снижение жизнеспособности. Однако обработка BSO сильно потенцировала цитотоксический эффект 200 мкМ формальдегида, а жизнеспособность клеток этой группы была наименьшей среди групп, представленных в таблице 4.

Таблица 4. Влияние предобработки HUVEC 200 мкМ бутионин сульфоксимином (BSO) на цитотоксический эффект формальдегида

Экспериментальная группа	Поглощение	Значимость различий
Эксперимент 1:		
a. Контроль (без обработки)	$1,18 \pm 0,13$	e*,f
b. BSO	$1,11 \pm 0,12$	f
c. 50 мкМ формальдегид	$1,15 \pm 0,14$	e*,f
d. 50 мкМ формальдегид + BSO	$0,94 \pm 0,17$	f
e. 200 мкМ формальдегид	$0,88 \pm 0,12$	a*,c*,f
f. 200 мкМ формальдегид + BSO	$0,12 \pm 0,02$	a,b,c,d,e

Представлены средние величины  $\pm$  стандартные ошибки определений четырех различных культур. Значимость различий  $p < 0,01$ , в случаях, обозначенных \*  $p < 0,05$ .

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты настоящей работы подтверждают, что индуцированная аллиламином цитотоксичность может быть продемонстрирована на HUVEC подобно предыдущим наблюдениям на клетках сердечно-сосудистой системы из разных видов (см. введение). Добавление гомогената пупочной артерии к культурам существенно потенцировало эти эффекты аллиламина. В пользу того, что токсический эффект обусловлен метаболизмом аллиламина до акролеина (и  $H_2O_2$ ) в гомогенате под действием SSAO свидетельствует полное предупреждение токсичности селективным ингибитором этого фермента - семикарбазидом, а также пропаргиламином - неселективным ингибитором SSAO/MAO. Селективный ингибитор MAO паргилин был неэффективен. Перечисленные вещества в использованных нами концентрациях являются необратимыми ингибиторами этих аминоксидаз, вызывающими полное или практически полное ингибирование этих ферментов в тканевых гомогенатах. Хотя превращение аллиламина в акролеин показано в прямых экспериментах на гомогенатах сердечно-сосудистой ткани человека [33] наши данные свидетельствуют в пользу того, что именно активность SSAO обуславливает это превращение. Интересно, что небольшое, но статистически значимое снижение жизнеспособности HUVEC происходит под действием 100 мкМ аллиламина и в отсутствие гомогената. Это может быть обусловлено метаболизмом аллиламина под действием SSAO плазмы быка, присутствующей в сывороточном компоненте среды и/или под действием

некоторой активности SSAO, ассоциированной с HUVEC, хотя сообщение о том, что культивируемые HUVEC не экспрессируют значительных количеств SSAO [26] свидетельствует против последнего предположения. Полное подавление ингибиторами SSAO токсичности, индуцированной 50 мкМ аллиламином, предполагает что она полностью зависит от метаболизма аллиламина под действием SSAO без прямого токсического эффекта этой концентрации аллиламина на клетки.

Основная причина выбора для изучения токсических эффектов акролеина и формальдегида на жизнеспособность HUVEC обусловлена общей характерной особенностью альдегидов образующихся *in vitro* под действием SSAO гомогенатов тканей разных видов при метаболизме алифатических аминов - аллиламина и метиламина, соответственно [11,12]. Существование метиламина как физиологически встречающегося амина, продуцируемого в различных метаболических путях, вовлеченных в деградацию адреналина, креатинина и саркозина, предполагает, что формальдегид может образовываться *in vivo* в местах локализации активности SSAO [32] таких как кровеносные сосуды. Поэтому экспозиция эндотелия к формальдегиду может возникать из-за локализации значительных количеств SSAO в плазме и гладкой мускулатуре сосудов. В недавних исследованиях токсичность метиламина в отношении культивируемых HUVEC связывали с образованием формальдегида под действием SSAO, что привело к предположению о вкладе повышенных при сахарном диабете уровней SSAO и метиламина в развитие сосудистых нарушений, найденных при этом заболевании [26]. Аминоацетон - другой эндогенно встречающийся алифатический амин, который может превращаться под действием SSAO в потенциально токсический альдегид - метилглиоксаль [34]. Правда, пока неясно, может ли метаболизм аллиламина быть вовлечен в механизм повреждения клеток сосудов. Это требует дальнейших исследований.

В настоящих исследованиях формальдегид был гораздо менее токсичен в отношении HUVEC чем акролеин. Использованное определение цитотоксичности дает возможность оценить жизнеспособность выживших клеток в их конечной точке, в то время как более тонкие (и не летальные), но тем не менее вредные для клеточных функций эффекты могут проявляться при низких концентрациях формальдегида, более близких к его нормальному уровню в клетке или крови - около 2,6 мкг/г крови [35]. Известно, что клеточный GSH играет важную роль в конъюгировании с акролеином и формальдегидом (также как и с метилглиоксалем) для защиты клеток от потенциальной токсичности, возникающей из-за способности этих агентов ковалентно реагировать с существенными макромолекулами (белками, нуклеиновыми кислотами), нарушая их нормальные функции. Детоксикация акролеина может заключаться в образовании долгоживущего аддукта с GSH, ведущего к истощению клеточного GSH, что уже было ранее продемонстрировано с культивируемыми гладко-мышечными и эндотелиальными клетками [23, 36]. Внутриклеточный метаболизм GSG-аддуктов формальдегида (до формиата) и метилглиоксаля (до D-лактата) происходит при участии GSH-зависимых ферментов - формальдегиддегидрогеназы и глиоксалазы, соответственно, которые регенерируют GSH из этих аддуктов [14, 15]. Это вовлечение GSH в защиту от альдегидной токсичности подтверждается и нашими данными, что после обработки HUVEC 200 мкМ BSO (концентрация, вызывающая истощение GSH на 98% в этих клетках [37]), происходила существенная потенциация токсического эффекта формальдегида.

В настоящей работе мы обсудили возможную роль SSAO в метаболизме алифатических аминов *in vivo* до их соответствующих и потенциально токсических альдегидов. Однако в более широком контексте достоверно установлено, что экспозиция

человека к этим альдегидам может происходить прямо из окружающей среды и из метаболизма ксенобиотических и биологических веществ по независимым от SSAO путям. Например, источники акролеина в окружающей среде уже были приведены во введении этой статьи. Вдобавок, формальдегид является загрязнителем окружающей среды, найденном в сигаретном дыме. Он также образуется в организме в качестве продукта окислительного деметилирования различных лекарств под действием оксидаз со смешанными функциями [13, 38]. Является или нет экспозиция к этим или похожим алифатическим альдегидам (продуцируемым при участии SSAO или другими механизмами) сопоставимой с нарушением эндотелиальной функции *in vivo* подобным образом, ведущим к значительным сосудистым нарушениям, представляет значительный интерес для будущего исследования.

Авторы признательны сотрудникам родильного отделения найнвеллского госпиталя (Ninewells Hospital Maternity Unit) за помощь в получении пупочных канатиков. Эта работа поддержана программой Европейского сообщества (EC Human Capital and Mobility Program, CHRXT 930256).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Davies M.G. and Hagen P.O.* (1993) *Annals of Surgery* 218, 593-609.
2. *Ramos K.S.* (1992) In *Cardiovascular Toxicology, Second Edition.* (Ed. D. Acosta). Raven Press, New York, pp 483-516.
3. *Waters L.L.* (1948) *American Heart Journal* 35, 212-220.
4. *Donomae I., Matsumoto Y., Kokubu T. and Koide R.* (1957) *Circulation Research* 5, 645-649.
5. *Will J.A., Rowe G.G., Olson C. and Crumpton C.W.* (1971) *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology* 2, 61-66.
6. *Lalich J.J. and Paik W.C.W.* (1972) *American Journal of Pathology* 66, 225-240.
7. *Waters L.L.* (1962) *Yale Journal of Biology and Medicine* 35, 113-121.
8. *Boor P.J. and Hysmith R.M.* (1987) *Toxicology* 44, 129-145.
9. *Boor P.J., Hysmith R.M. and Sanduja R.* (1990) *Circulation Research* 66, 249-252.
10. *Grossman S.L., Alipui C. and Ramos K.* (1990) *In Vitro Toxicology* 3, 303-307.
11. *Lyles G.A.* (1994) *Journal of Neural Transmission [Suppl.]* 41, 387-396.
12. *Lyles G.A.* (1996) *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28, 259-274.
13. *Boeniger M.F.* (1987) *American Industrial Hygiene Association Journal* 48, 900-908.
14. *Heck H. d'A., Casanova M. and Starr T.B.* (1990) *Critical Reviews in Toxicology* 20, 397-426.
15. *Thornalley P.J.* (1990) *Biochemical Journal* 269, 1-11.
16. *Hysmith R.M. and Boor P.J.* (1986) *Toxicology* 38, 141-150.
17. *Hysmith R.M. and Boor P.J.* (1988) *Toxicology* 51, 133-145.
18. *Ramos K., Grossman S.L. and Cox L.R.* (1988) *Toxicology and Applied Pharmacology* 95, 61-71.
19. *Toraason M., Luken M.E., Breitenstein M., Krueger J.A. and Biagini R.E.* (1989) *Toxicology* 56, 107-117.
20. *Beauchamp R.O., Andjelkovich D.A., Klierzman A.D., Morgan K.T. and Heck H D'A* (1985) *Critical Reviews in Toxicology* 14, 309-380.
21. *Fraiser L.H., Kanekal S. and Kehrer J.P.* (1991) *Drugs* 42, 781-795.
22. *Alarcon R.A.* (1970) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 137, 365-372.
23. *Ramos K.S. and Thurlow C.H.* (1993) *Journal of Toxicology and Environmental Health* 40, 61-76.
24. *Shan X., Aw T.Y. and Jones D.P.* (1990) *Pharmacology and Therapeutics* 47, 61-71.

25. Blicharski J.R.D. and Lyles G.A. (1991) *British Journal of Pharmacology* 102, 184P.
26. Yu P.H. and Zuo D-M. (1993) *Diabetes* 42, 594-603.
27. Precious E. and Lyles G.A. (1988) *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 40, 627-633.
28. Pino R. and Lyles G.A. (1995a) *British Journal of Clinical Pharmacology* 40, 187P.
29. Pino R. and Lyles G.A. (1995b) *Pharmacological Research [Supplement]* 31, 147
30. Gimbrone M.A., Cotran R.S. and Folkman J. (1974) *Journal of Cell Biology* 60, 673-684.
31. Mosmann T. (1983) *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
32. Precious E., Gunn C.E. and Lyles G.A. (1988) *Biochemical Pharmacology* 37, 707-713.
33. Boor P.J. and Nelson T.J. (1982) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 14, 679-682.
34. Lyles G.A. and Chalmers J. (1992) *Biochemical Pharmacology* 43, 1409-1414.
35. Heck H. d'A., Casanova-Schmitz M., Dodd P.B., Schachter E.N., Witek T.J. and Tosun T. (1985) *American Industrial Hygiene Association Journal* 46, 1-3.
36. Patel J.M. and Block E.R. (1993) *Toxicology and Applied Pharmacology* 122, 46-53.
37. Kashiwagi A., Asahina T., Ikebuchi M., Tanaka Y., Takagi Y., Nishio Y., Kikkawa R. and Shigeta Y. (1994) *Diabetologia* 37, 264-269.
38. Heck H. d'A., White E.L. and Casanova-Schmitz M. (1982) *Biomedical Mass Spectrometry* 9, 347-353.

**INFLUENCES OF SEMICARBAZIDE-SENSITIVE AMINE OXIDASE ACTIVITY AND CELLULAR GLUTATHIONE UPON CYTOTOXIC EFFECTS OF ALLYLAMINE, ACROLEIN AND FORMALDEHYDE IN HUMAN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS**

ROBERTO PINO AND GEOFFREY A. LYLES

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology,  
University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School,  
Dundee DD1 9SY, UK

The ability of allylamine (AA) administration to produce vascular lesions resembling atherosclerotic disease in animals, has been linked to metabolism of AA to the toxic aldehyde acrolein (ACR) by a semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) found in plasma and in vascular smooth muscle. Here, we have assessed the cytotoxicity of AA and ACR towards cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). After 20h treatment, 50  $\mu$ M AA alone had no effect and 100  $\mu$ M AA produced a modest reduction in cell viability. However, both concentrations produced considerable cell death when incubated with HUVEC in the presence of human umbilical artery homogenate as a source of human vascular SSAO activity. The cytotoxic actions of 50  $\mu$ M AA were not altered by coincubation with 100  $\mu$ M pargyline (an inhibitor of monoamine oxidase, MAO) but were completely prevented by 100  $\mu$ M semicarbazide (SSAO inhibitor) and propargylamine (MAO/SSAO inhibitor). ACR at 50 and 100  $\mu$ M was considerably cytotoxic, but had little effect at 5 and 10  $\mu$ M. Since SSAO can also metabolize the biogenic aliphatic amine methylamine to formaldehyde (FA), effects of this aldehyde upon HUVEC were also studied. 50  $\mu$ M FA did not significantly alter HUVEC viability whereas 200  $\mu$ M FA produced a small but significant reduction in viability. However, 200  $\mu$ M FA (but not 50  $\mu$ M FA) was highly cytotoxic in HUVEC pretreated for 24h with the glutathione (GSH) synthesis inhibitor, D,L-buthionine sulphoximine (200  $\mu$ M). These results suggest that endothelial integrity or function in blood vessels could be affected by these aliphatic aldehydes as environmental pollutants, dietary contaminants, and possible products of metabolic pathways, including those involving the action of SSAO upon biogenic and xenobiotic aliphatic amines. The availability of GSH-dependent mechanisms for metabolizing these aldehydes may have an important protective influence.

**Key words:** semicarbazide sensitive amine oxidase, glutathione, cytotoxic effect, allylamine, acrolein formaldehyde, cultivated human endothelial cells.