

РАЗЛИЧИЯ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ РАЗНЫХ ДОНОРОВ

© Н. Н. Склянкина, Н. В. Болдырева, О. Н. Щегловитова

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва;
электронный адрес: scheglovitova@rambler.ru

Эндотелий кровеносных сосудов в организме принимает участие в выполнении многочисленных функций в физиологических условиях и при патологических процессах. Разработка метода выделения и культивирования клеток эндотелия дала возможность моделировать процессы, происходящие в эндотелии сосудов. В отличие от перевиваемых культур исследования на первичных культурах клеток приводят к большому разбросу в результатах. В данной работе сравнили культуры, полученные из пуповин от 20 доноров, по продукции ряда маркеров, частично характеризующих функциональное состояние эндотелия. Обнаружили, что культуры по уровню продукции всех исследованных маркеров после 3 ч культивирования клеток можно было условно разделить на высоко- и низкопродуцирующие. При анализе цитокинового профиля выявили, что уровень спонтанной продукции интерлейкина (ИЛ)-1 β в группах не меняется при культивировании клеток 24 и 48 ч, тогда как уровень продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 увеличивались к 24 и 48 ч, и разница между группами нивелировалась; увеличение продукции фактора некроза опухоли альфа происходило при культивировании культур только в низкопродуцирующей группе. Увеличение содержания растворимых Р-селектина и Е-селектина в культуральной среде наблюдалось при культивировании только низкопродуцирующих культур, тогда как увеличение содержания растворимых молекул клеточной адгезии sICAM-1 отмечалось при культивировании высокопродуцирующих культур; увеличение содержания растворимой молекулы адгезии эндотелия и тромбоцитов sPECAM-1 было выявлено при культивировании как высоко-, так и низкопродуцирующих культур, при этом сохранялась разница в уровне ее содержания между группами. Содержание в культуральной среде растворимого VE-кадхерина не менялось при культивировании клеток. Уровень нитрита, отражающий содержание оксида азота, увеличивался в культуральной среде при культивировании всех культур, при этом разница между группами сохранялась; концентрация эндотелина-1 также увеличивалась, однако значения этого маркера в среде отдельных культур были близкими, поэтому не удалось создать группы, отражающие уровни его продукции. Содержание фактора фон Виллебранда увеличивалось в культуральной среде при культивировании культур обеих групп, однако разница между группами не сохранялась. Содержание в культуральной среде матриксной металлопротеиназы-1 увеличивалось при культивировании культур. Следовательно, культуры эндотелия разных доноров различаются по способности производить маркеры функциональной активности и характеризуют особенности доноров клеток. Полученные результаты дают возможность моделировать процессы, происходящие в эндотелии сосудов, с учетом индивидуальных особенностей культур и позволяют предполагать необходимость более тщательного подхода к оценке результатов, получаемых на первичной культуре эндотелия.

Ключевые слова: культура эндотелия пупочной вены, цитокины, растворимые МКА, NO, эндотелин-1, фактор фон Виллебранда, ММП-1.

Эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, является диссеминированным органом, выполняющим в организме многочисленные функции. Эндотелий сосудов (ЭС) принимает участие в функционировании иммунной системы, поддерживает антивоспалительный фенотип в физиологических условиях и принимает участие в развитии воспаления при патологических процессах (Cines et al., 1998; Biederman, 2001; Tedgui, Malla, 2001). ЭС продуцирует провоспалительные цитокины, которые активируют экспрессию молекул клеточной адгезии (МКА), влияющих на адгезию лейкоцитов на поверхность клеток эндотелия и миграцию лейкоцитов из кровотока (Pober, Cotran, 1990; Фрейдлин, Шейкин,

2001; Smith, 2008). К числу таких цитокинов относятся интерлейкин (ИЛ)-1 β , ИЛ-6, фактор некроза опухоли альфа (ФНО α) и хемокин ИЛ-8. Отсоединение от поверхности активированного эндотелия МКА приводит к регуляции этими молекулами рекрутования лейкоцитов и их трансмиграции (Garton et al., 2006; Wallez, Huber, 2008). Репаративные процессы в физиологических условиях, а также хроническое течение воспалительного процесса приводят к разрастанию сосудов — ангиогенезу (Vestweber, 2007), контролируемому факторами роста эндотелия и матриксными металлопротеиназами. ЭС продуцирует вазодилататоры и вазоконстрикторы (например, оксид азота и эндотелин-1 соответственно), физиологиче-

ская продукция которых заключается в поддержании нормального тонуса сосудов; при различных воздействиях баланс в их продукции нарушается, что приводит к каскаду изменений гомеостаза организма, в том числе и течения воспалительного процесса. Фактор фон Виллебранда (ФФВ), продуцируемый ЭС, является одним из компонентов системы коагуляции—антикоагуляции (Cines et al., 1998).

Экспериментальные исследования *in vitro* включают в себя использование как первичных, так и перевиваемых культур клеток. Оба вида культур имеют как преимущества, так и недостатки: результаты исследований, полученные на перевиваемых культурах клеток, дают более близкие показатели, тогда как первичные культуры клеток отражают особенности генетического разнообразия доноров. Для моделирования процессов, происходящих в ЭС, наиболее широко используется первичная культура клеток эндотелия кровеносных сосудов, полученная из пупочной вены человека (ЭКПВЧ) (Jaffe, 1980; Pober, Cotran, 1990; Cines et al., 1998). Поэтому цель работы заключалась в оценке уровня функциональных различий между культурами эндотелия, полученными от разных доноров, и возможности стандартизовать получаемые результаты. В данной работе сравнили культуры эндотелия, полученные из пупочных вен разных доноров, по основным показателям функциональной активности: продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α), спонтанному отсоединению от ЭКПВЧ МКА (Р-селектин, Е-селектин, ICAM-1, РЕСАМ-1 и VE-кадхерин), спонтанной продукции взводителя и вазоконстриктора — оксида азота и эндотелина-1, спонтанному синтезу ФФВ и спонтанной продукции матриксной металлопротеиназы-1 (ММП-1).

Материал и методика

Культура эндотелия. Клетки эндотелия выделяли из вены пупочных канатиков, полученных от здоровых женщин после нормальных родов по методам Яффе (Jaffe, 1980) и Щегловитовой и соавторов (Scheglovitova et al., 2002). Коротко: пупочные вены были канюлированы, залиты 0,15%-ным раствором диспазы в физиологическом растворе и инкубированы в течение 30 мин при 37 °C. Затем вены были промыты физиологическим раствором, клетки были собраны из перфузационного раствора центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин, ресуспендированы в среде 199 с 10%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки, эндотелиального фактора роста, гепарина (100 мкг/мл) и гентамицина (50 мкг/мл) и перенесены в пластиковые флаконы. Культивирование клеток проводили в инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂. После образования монослоя клетки снимали раствором трипсина с ЭДТА и пересевали с плотностью 10⁵ кл./см² в 24-луночные платы. Для работы использовали культуры только 1-го пассажа на 4-е сут после образования монослоя. Образцы культуральной среды отбирали в динамике культивирования клеток, меняя полностью среду на свежую первоначального состава, и хранили при -20 °C до тестирования. Оценке были подвергнуты результаты, полученные при использовании культур от 20 доноров.

Реактивы: среда 199 (Gibco, США), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), трипсин-ЭДТА (Gibco, США) и диспаза (MP Biomedicals, США).

Оценка содержания исследуемых факторов. Тестирование содержания в среде исследуемых факторов проводили методом иммуноферментного анализа, используя коммерческие тест-системы ELISA ИЛ-1 β , ELISA ИЛ-6, ELISA ИЛ8/NAP, ELISA TNF α (Biosource, Бельгия), ELISA sP-selectin, ELISA sE-selectin, ELISA ICAM-1, ELISA sPECAM-1, ELISA sVE-cadherin (Bender Medsystems), Total NO Nitrite/Nitrate Assay, ProMMP-1 Assay (R&D System, Великобритания), Endothelin-1 Assay Kit (IBL Biomedica Gruppe, США), vWF : Ag ELISA (Technoclone TC, США) согласно рекомендациям фирм-производителей.

Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента и оценивали в соответствии с *t*-критерием Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов показал, что почти по каждому показателю в одном интервале времени культивирования клеток разница между максимальными и минимальными значениями была в пределах от 2 до более чем 10 раз. После статистической обработки всех результатов по отдельным показателям не было отмечено достоверной разницы между значениями, полученными после 6, 24 и 48 ч культивирования клеток по сравнению со значениями, полученными через 3 ч от начала эксперимента. Вследствие этого по каждому показателю, используя значения 3-часового срока как исходного, были образованы высоко- и низкопродуцирующие группы, между которыми разница была статистически достоверной. После этого значения показателей в каждой группе были также обработаны статистически (табл. 1—3).

Из результатов определения цитокинов, представленных в табл. 1, видно, что содержание ИЛ-1 β не менялось в течение всего времени исследования в высоко- и низкопродуцирующих группах, так же как и при суммарной оценке результатов. Поскольку среда культивирования отбиралась полностью на каждом сроке, следовательно, к 6, 24 и 48 ч происходило восстановление уровня продуцируемого цитокина до первоначального значения, при этом сохранялась разница между группами в течение всего срока исследования. Отмечено увеличение продукции ИЛ-6 после 24 и 48 ч культивирования клеток в высоко- и низкопродуцирующих группах, так же как и при суммарной оценке результатов. Разница в содержании этого цитокина между высоко- и низкопродуцирующей группами сохранялась только в течение 6 ч, но не было разницы между уровнями цитокина в группах культивирования 24 и 48 ч. Следовательно, к 24 ч и затем к 48 ч культивирования клеток нарабатывается количество ИЛ-6, одинаковое в обеих группах. Такая же закономерность отмечена при анализе результатов, полученных при тестировании ИЛ-8 в культуральной среде культивируемых ЭКПВЧ: одинаковое увеличение спонтанной продукции этого цитокина через 24 и 48 ч по сравнению с 3-часовым сроком в группах высокопродуцирующей, низкопродуцирующей и суммарной. Разница между группами была установлена только после 3 ч культивирования ЭКПВЧ, но не выявлялась после 24 и 48 ч культивирования клеток. При тестировании количества в культуральной среде ФНО α только в низкопродуцирующей группе отмечено увеличение уровня этого показателя после 6 и 48 ч культивирования. Разница между группами сохранялась до 24 ч культивирования.

Таблица 1

Спонтанная продукция цитокинов (пг/мл) культурами ЭКПВЧ в динамике

Показатель	Продуцирующая способность ЭКПВЧ	Концентрация цитокинов, пг/мл, синтезированных в культуральную среду за различное время, ч			
		3	6	24	48
ИЛ-1 β	Высокопродуцирующая	14.97 ± 0.20	15.07 ± 0.50	15.20 ± 0.50	14.96 ± 0.05
	Низкопродуцирующая	1.70 ± 0.10 +++	2.30 ± 0.16 +++	1.95 ± 0.20 +++	2.20 ± 0.40 +++
	Суммарная	7.01 ± 2.20	6.40 ± 2.17	7.30 ± 2.17	8.60 ± 2.41
ИЛ-6	Высокопродуцирующая	18.06 ± 2.60	22.80 ± 3.60	121.90 ± 21.80 ^a	128.21 ± 28.30 ^b
	Низкопродуцирующая	6.10 ± 0.70 +++	4.54 ± 0.15 +++	80.60 ± 22.10 ^b	104.97 ± 20.80 ^b
	Суммарная	12.10 ± 2.40	13.67 ± 0.50	98.51 ± 14.80 ^a	119.50 ± 18.70 ^a
ИЛ-8	Высокопродуцирующая	254.13 ± 18.10	Не исследовали	1277.30 ± 430.30 ^b	1557.97 ± 638.10 ^b
	Низкопродуцирующая	51.62 ± 6.67 +++	80.76 ± 18.80	628.03 ± 228.80 ^b	556.90 ± 189.80 ^b
	Суммарная	152.90 ± 46.10	150.90 ± 52.20	591.10 ± 115.70 ^b	867.80 ± 300.10 ^b
ФНО α	Высокопродуцирующая	6.24 ± 0.80	6.56 ± 0.70	5.90 ± 0.60	Не исследовали
	Низкопродуцирующая	1.23 ± 0.20 ++	3.70 ± 0.60 ^b	2.67 ± 1.10 ^b +	2.83 ± 0.70 ^b
	Суммарная	4.87 ± 0.90	5.80 ± 0.70	5.70 ± 0.74	4.30 ± 1.60

Примечание. + – $P \leq 0.05$, ++ – $P \leq 0.01$, +++ – $P \leq 0.001$ — показатели высокопродуцирующей группы относительно низкопродуцирующей группы. ^a $P \leq 0.001$, ^b $P \leq 0.01$, ^b $P \leq 0.05$ — показатели 6, 24 и 48 ч относительно 3 ч.

Таблица 2

Спонтанное отсоединение молекул клеточной адгезии (МКА) от ЭКПВЧ в динамике

Показатель	Продуцирующая способность ЭКПВЧ	Концентрация растворимых МКА, пг/мл, синтезированных в культуральную среду за различное время, ч			
		3	6	24	48
sР-селектин	Высокопродуцирующая	13.34 ± 0.04	23.21 ± 9.91	13.34 ± 0.40	13.34 ± 0.04
	Низкопродуцирующая	0.94 ± 0.01 +++	0.86 ± 0.15 ^a +++	1.35 ± 0.03 ^b +++	Не исследовали
	Суммарная	4.54 ± 1.2	6.20 ± 2.90	4.99 ± 1.10	5.01 ± 1.90
sE-селектин	Высокопродуцирующая	3.32 ± 0.70	3.30 ± 0.10	3.40 ± 0.13	3.35 ± 0.60
	Низкопродуцирующая	1.80 ± 0.04 +++	1.70 ± 0.01 +++	1.90 ± 0.01 ^b +++	3.80 ± 0.10 ^b xxx
	Суммарная	2.95 ± 0.20	2.90 ± 0.20	3.02 ± 0.20	3.51 ± 0.40
sICAM-1	Высокопродуцирующая	9.30 ± 0.10	9.43 ± 0.20	9.83 ± 0.02 ^a	10.42 ± 0.05 ^b xxx
	Низкопродуцирующая	6.60 ± 0.30 +++	6.61 ± 0.30 +++	7.47 ± 0.80 +++	7.17 ± 0.20 +++
	Суммарная	7.20 ± 0.40	7.20 ± 0.50	8.07 ± 0.60	8.07 ± 0.40
sPECAM	Высокопродуцирующая	1.34 ± 0.03	Не исследовали	2.10 ± 0.02 ^b	2.30 ± 0.20 ^a
	Низкопродуцирующая	0.72 ± 0.04 +++	1.04 ± 0.30	1.54 ± 0.20 ^a +++	1.50 ± 0.04 ^b ++
	Суммарная	0.99 ± 0.10	1.12 ± 0.20	1.80 ± 0.20 ^b	1.87 ± 0.20 ^b
VE-кадхерин	»	0.66 ± 0.07	1.10 ± 0.50	0.87 ± 0.35	1.02 ± 0.30

Примечание. + – $P \leq 0.05$, ++ – $P \leq 0.01$, +++ – $P \leq 0.001$ — показатели высокопродуцирующей группы относительно низкопродуцирующей группы. ^a $P \leq 0.01$, ^b $P \leq 0.001$, ^b $P \leq 0.05$ — показатели 6, 24 и 48 ч относительно 3 ч. xxx — $P \leq 0.001$ — показатель 48 ч относительно 24 ч.

Таблица 3

Спонтанная продукция оксида азота, мкМ/л, эндотелина-1, фМ/мл, фактора фон Виллебранда, МЕ/мл, и матриксной металлопротеиназы 1, нг/мл, ЭКПВЧ в динамике

Показатель	Продуцирующая способность ЭКПВЧ	Концентрация исследуемых веществ, синтезированных в культуральную среду за время, ч			
		3	6	24	48
Нитрит	Высокопродуцирующая	44.0 ± 3.2	43.60 ± 2.30	72.42 ± 12.60 ^a	64.56 ± 10.90 ^a
	Низкопродуцирующая	18.5 ± 2.2 +++	21.63 ± 0.10 ^b ++	27.50 ± 2.10 ^b + +	34.20 ± 5.80 ^a + +
	Суммарная	33.4 ± 4.3	30.40 ± 5.40	53.70 ± 9.80 ^a	50.80 ± 7.80 ^a
Эндотелин	»	22.6 ± 3.9	23.30 ± 1.30	187.00 ± 8.80	214.00 ± 15.10 ^b xxx
ФфВ	Высокопродуцирующая	3.9 ± 0.6	4.00 ± 1.23	16.90 ± 4.20 ^b	21.54 ± 5.10 ^b
	Низкопродуцирующая	1.3 ± 0.2 +++	Не исследовали	12.50 ± 12.50 ^b	14.80 ± 1.80 ^b
	Суммарная	2.6 ± 0.5	3.40 ± 1.10	14.90 ± 1.90 ^b	17.50 ± 2.04 ^b
ММП-1	»	12.7 ± 5.6	10.00 ± 0.70	98.60 ± 13.40 ^b	122.40 ± 16.80 ^b

Примечание. + – $P \leq 0.05$, ++ – $P \leq 0.01$, +++ – $P \leq 0.001$ — показатели высокопродуцирующей группы относительно низкопродуцирующей группы. ^a $P \leq 0.05$, ^b $P \leq 0.001$, ^b $P \leq 0.01$ — показатели 6, 24 и 48 ч относительно 3 ч. xxx — $P \leq 0.001$ — показатели 48 ч относительно 24 ч.

Отмеченная разница во времени максимального накопления каждого из цитокинов в культуральной среде ЭКПВЧ (3 ч для ИЛ-1 β , 6 ч для ФНО α и 24 ч для ИЛ-6 и ИЛ-8) связана с разницей во времени экспрессии иРНК для каждого цитокина (Кетлинский, Симбирцев, 2008). Клетки, продуцирующие ИЛ-1 β и ФНО α , сохраняли высокий или низкий уровень продукции в течение всего срока исследования. Максимальный уровень накопления в культуральной среде ЭКПВЧ ИЛ-6 и ИЛ-8 отмечен к 24 ч, затем к 48 ч, уровень этих цитокинов в низкопродуцирующих группах достигал таких же значений, как в высокопродуцирующих группах.

При оценке спонтанно отсоединившихся от ЭКПВЧ МКА в динамике культивирования видно, что к 6 ч происходило уменьшение содержания растворимого Р-селектина в культуральной среде в низкопродуцирующей группе и последующее увеличение его количества к 24 ч (табл. 2). Уровень Р-селектина в высоко- и низкопродуцирующей группах исходно различался более чем в 10 раз, и разница между группами сохранялась в течение всего времени исследования. Известно, что Р-селектин локализуется на поверхности клеток эндотелия в течение 1 ч после выхода из цитоплазматических телец Вейбелль—Палладе (Cines et al., 1998). Увеличение содержания растворимого Р-selectin к 24 ч, возможно, связано с несколькими циклами экспрессии этой молекулы на клетках эндотелия. Увеличение количества растворимого E-selectin в культуральной среде происходило только в низкопродуцирующей группе к 24 ч, при этом сохранялась разница между группами. К 48 ч культивирования клеток количество растворимого E-selection увеличилось по сравнению с его содержанием к 24 ч и не отличалось от показателя в высокопродуцирующей группе. Это, по-видимому, связано с тем, что максимальная экспрессия E-selection на клетках эндотелия происходит к 24 ч (Leeuwenberg, 1992) и только после этого происходит накопление в культуральной среде отсоединившегося E-selection. Увеличение содержания sICAM-1 в культуральной среде ЭКПВЧ отмечалась только в группе высокопродуцирующих клеток к

24 ч, затем происходило дополнительное увеличение к 48 ч, при этом сохранялась разница между низко- и высокопродуцирующими культурами. Накопление растворимого ICAM-1 к этому времени связано со временем активации экспрессии ICAM-1 на клетках эндотелия, которая выходит на плато начиная с 24 ч (Leeuwenberg, 1992). Увеличение количества растворимой молекулы адгезии эндотелия и тромбоцитовPECAM-1 в культуральной среде культивируемых ЭКПВЧ происходило в обеих группах и суммарно к 24 и 48 ч, что также связано со временем активации экспрессии PECAM-1 на клетках эндотелия (Vestweber, 2007). Разница в накоплении этой молекулы сохранялась между высоко- и низкопродуцирующей группами в течение всего срока исследования. Содержание растворимого VE-кадхерина было изначально на одном уровне и не менялось в динамике культивирования ЭКПВЧ, т. е. к 6, 24 и 48 ч происходило восстановление его количества в культуральной среде до первоначального значения. Такая монотонность в отсоединении VE-кадхерина от поверхности клеток эндотелия связана, по-видимому, с особой ролью VE-кадхерина в отличие от других МКА, действованных в рекрутинге лейкоцитов и их трансмиграции: он обеспечивает контакт между клетками эндотелия, и его экспрессия на эндотелии тормозит адгезию лейкоцитов (Gotsch, 1997; Vestweber, 2007; Wallez, Huber, 2008).

Способность ЭКПВЧ продуцировать оксид азота оценивалась по содержанию в культуральной среде нитритов, так как NO является короткоживущим радикалом, а нитрит является его стабильным метаболитом (Власова, 2006) (табл. 3). Отмечалось увеличение содержания нитритов в культуральной среде ЭКПВЧ в низкопродуцирующей группе начиная с 6 ч и затем в обеих группах к 24 ч; количество нитрита во всех группах не менялось к 48 ч. По-видимому, компонентов культуральной среды достаточно только на 24 ч для активации продукции оксида азота и образования его метаболитов. Однако в течение всего времени исследования сохранялась разница между высоко- и низкопродуцирующими группами. В уровне

продукции эндотелина все исследованные культуры эндотелия были близкими. В динамике культивирования клеток происходило увеличение содержания эндотелина к 24 ч и затем дополнительное увеличение к 48 ч. Можно предположить, что в то время как все клетки эндотелия активно продуцируют вазоконстриктор эндотелин, продукция вазодилататора оксида азота достоверно различается в эндотелии разных доноров клеток, и в большей степени, чем продукция эндотелина, зависит от воздействия внешних факторов.

Разница в содержании ФФВ в культуральной среде к 3 ч культивирования клеток дала возможность объединить результаты в две условные группы, однако при последующем культивировании клеток эта разница не сохранялась. Увеличение содержания ФФВ в культуральной среде происходило в обеих группах к 24 ч и затем не менялось к 48 ч культивирования клеток эндотелия.

Исходные количества ММП-1 в культуральной среде исследованных культур были близкими, поэтому все показатели были включены в одну группу. Содержание ММП-1 увеличивалось в культуральной среде к 24 ч и не менялось на следующем сроке исследования. Полученные результаты дают возможность заключить, что культивируемые клетки эндотелия, полученные от разных доноров, стабильно продуцируют ФФВ и ММП-1, факторы, связанные с поддержанием тока крови в сосудах, тромбообразованием и ангиогенезом.

Таким образом, первичные культуры клеток эндотелия сосудов человека спонтанно продуцируют факторы, характеризующие их функциональную активность. Культуры эндотелия, полученные от разных доноров, различаются по способности продуцировать некоторые из этих факторов, тогда как ряд факторов секреции является всеми культурами на одном уровне. Отмечены различия в профиле продукции исследованных цитокинов и профиле отсоединения от клеток МКА, показана разница в продукции вазодилататора оксида азота и вазоконстриктора эндотелина, выявлена стабильность в продукции ФФВ и ММП-1. В работе использовали только 1-й пассаж клеток после их выделения из пупочных канатиков, который сохраняет исходный фенотип эндотелия (Pober, Cotran, 1990). Поэтому можно заключить, что полученные результаты определения функциональной активности эндотелия отражают функциональную активность эндотелия пупочной вены и характеризуют особенности доноров клеток. Полученные результаты дают возможность моделировать процессы, происходящие в эндотелии сосудов, и интерпретация результатов возможна только с учетом индивидуальных особенностей культур; эти результаты поз-

воляют предполагать необходимость более тщательного подхода к оценке результатов, получаемых на первичной культуре эндотелия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (проект 3505).

Список литературы

- Власова М. А., Смирнов Б. В., Покидышев Д. А., Машина С. Ю., Ванин А. Ф., Малышев И. Ю., Манухин Е. Б. 2006. Механизм адаптации сосудистой системы к хроническому изменению уровня оксида азота в организме. Бюл. эксперим. биол. мед. 142 (12) : 626—630.
- Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. 2008. Цитокины. СПб.: Фолиант. 550 с.
- Фрейдлин И. С., Шейкин Ю. А. 2001. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов. Мед. иммунол. 3 (4) : 499—514.
- Biederman B. C. 2001. Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity. New Physiol. Sci. 16 : 84—88.
- Cines D. B., Pollak E. S., Buck C. A. 1998. Endothelial cells in the physiology of vascular disorders. J. Amer. Soc. Hematol. 91 : 3527—3561.
- Garton K. J., Gough P. J., Raines E. W. 2006. Emerging role for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. J. Leukemic. Biol. 79 : 1105—1116.
- Gotsch U. 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment *in vivo*. J. Cell Sci. 110 : 583—588.
- Jaffe E. A. 1980. Culture of human endothelial cells derived from cord veins. Transplant. Res. 12 : 49—62.
- Leeuwenberg J. F., Smeets E. F., Shaffer M. A., Cinek T. A., Jeunhomme T. M., Ahern T. J., Buurman W. A. 1992. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells *in vitro*. Immunology. 77 : 543—549.
- Pober J. S., Cotran R. S. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. Physiol. Rev. 70 : 427—451.
- Scheglovitova O. N., Romanov Yu. A., Maksianina E. V., Svititskaya A. V., Pronin A. G. 2002. Herpes simplex type 1 virus infected human vascular endothelial cells induce the production of anti-viral and proinflammatory factors by peripheral blood leukocytes *in vitro*. Rus. J. Immunol. 7 (2) : 115—122.
- Smith C. W. 2008. Adhesion molecules and receptors. J. Allergy Clin. Immunol. 121 : 8375—8379.
- Tedgui A., Mallat Z. 2001. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. Circ. Res. 88 : 877—887.
- Vestweber D. 2007. Endothelial cell contacts in inflammation and angiogenesis. International Congress Series. 1302 : 17—25.
- Wallez Y., Huber P. 2008. Endothelial adherens and tight junction in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. Biochim. biophys. acta. 1778 : 794—809.

Поступила 24 V 2010

DIFFERENCES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF CULTIVATED HUMAN VASCULAR ENDOTHELIUM RECEIVED FROM DIFFERENT DONORS

N. N. Scklyankina, N. V. Boldyreva, O. N. Scheglovitova

N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology RAMS, Moscow;
e-mail: scheglovitova@rambler.ru

Endothelium of blood vessels in the organism is involved in carrying out numerous functions in normal and pathological processes. Development of the method of isolation and cultivation of endothelial cells has made it possible to model the processes occurring in vascular endothelium. Unlike continuous cell lines, research on primary cell cultures lead to wide variation in results. In this study, spontaneous production of markers characteri-

zing functional activities of endothelium were compared in endothelium cultures derived from umbilical cords of 20 donors. It was found that, based on the production levels of all investigated markers after 3 hours of cell cultivation, these cultures can be divided into high- and low-producing. Analysis of cytokine profiles revealed that the level of spontaneous production of IL-1 β in these groups did not vary during cell cultivation up to 24 and 48 hours, whereas the levels of IL-6 and IL-8 production increased to 24 and 48 hours, and the difference between groups became leveled; the increase in production of TNF α occurred only in cultures of low-producing group. The increase in amounts of sP- and sE-selectin in cultural medium was observed only under cultivation of low-producing cultures, whereas the increase in sICAM-1 was noted under cultivation of highly-producing cultures; the increase of sPECAM-1 was revealed under cultivation of both highly- and low-producing cultures. So, the difference in the levels of this CAM between the groups remained. The levels of sVE-cadherin in cultural medium did not vary in the course of cell cultivation. The levels of nitrite reflecting the amount of NO were increased in cultural medium in all cultures, and the difference between the groups remained; concentration of endothelin-1 was increased, however the values of this marker in the cultural medium of several cultures were similar, therefore, it was not possible to create groups reflecting levels of its production. The levels of von Willebrand Factor were increased in cultural medium under cultivation of cultures of both groups, however the difference between the groups did not remain. The levels of matrix metalloproteinase-1 in cultural medium increased under cultivation of cell cultures. Hence, endothelial cultures from different donors differ in their ability to produce markers of functional activity, and reflect the features of cell donors. The results obtained allow modeling the processes occurring in vascular endothelium taking into account the individual characteristics of cultures, and suggest the possibility of a more thorough approach to evaluating the results obtained using primary endothelium cultures.

Key words: culture of umbilical vein endothelium, cytokines, soluble CAM, NO, endothelin-1, vWF, MMP-1.