

## ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ И СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ

© Л. В. Антонова,<sup>1</sup> В. Г. Матвеева, М. Н. Чернова, Е. А. Великанова,  
А. В. Понасенко, А. С. Головкин

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний  
СО РАМН, Кемерово;

<sup>1</sup> электронный адрес: antonova.la@mail.ru

Изучали влияние непрерывной 3-суточной гипоксии разной степени на жизнеспособность, пролиферативную и секреторную активность эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES). Использовали газовую смесь трех составов (%): 1) 10 O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>, 85 Ar; 2) 5 O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>, 90 Ar; 3) 1 O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>, 94 Ar. В качестве контроля служили HUVES, культивируемые в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в условиях атмосферного содержания кислорода (21 %). Комплексная оценка результатов показала, что 3-суточное культивирование HUVES в присутствии 1 % O<sub>2</sub> приводит к патологической активации эндотелиоцитов — повышенному синтезу NO, сочетающемуся с выраженной секрецией эндотелина-1, IL-6, IL-8 и TNF-α, sVCAM-1, sE-кадгерина и sE-селектина, VEGF-A и bFGF, а также с замедленной пролиферацией. При культивировании HUVES в условиях 10 и 5 % O<sub>2</sub> уровень базальной секреции вышеперечисленных веществ был наименьшим на фоне повышенной пролиферативной активности. При культивировании эндотелиальных клеток в условиях атмосферного кислорода происходит их активация: секреция NO, IL-6, IL-8 и фактора фон Виллебранда через 3 сут превышает эти же показатели в случае содержания O<sub>2</sub> 10 и 5 %. Таким образом, более физиологическими условиями культивирования HUVES является газовая среда с пониженным до 5 % содержанием кислорода, в которой максимальна пролиферативная активность и минимальна базальная секреция. Повышение содержания кислорода до уровня атмосферного приводит к активации эндотелиоцитов с признаками развивающейся эндотелиальной дисфункции, а критическое снижение кислорода до 1 % вызывает развитие эндотелиальной дисфункции и снижает пролиферативный потенциал.

Ключевые слова: гипоксия, эндотелиальные клетки, пролиферация, дисфункция, цитокины.

Принятые сокращения: bFGF — базальный фактор роста фибробластов, HUVES — эндотелиальные клетки пупочной вены человека, IL — интерлейкин, NO — оксид азота, VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста.

Разработка методов выделения и культивирования различных типов клеток дала возможность моделировать *in vitro* патологические процессы, происходящие в организме человека. Экспериментальное воздействие на клетки бактериальных агентов, факторов воспаления и изменения оксигенации позволяет получать ответы на вопросы, связанные с механизмами запуска патологических состояний различных нозологий (Солодовникова и др., 2006; Ефименко и др., 2010; Старикова и др., 2012).

Эндотелий представляет собой тонкий монослой эпителиальных клеток мезенхимного происхождения, ограничивающий кровоток от более глубоких слоев стенки сосуда. Эндотелий является крупнейшим паракринным органом, играющим важную роль в поддержании сосудистого гомеостаза, тонуса и анатомической структуры сосудистой стенки. В покое клетки имеют низкий базовый уровень секреции, который значительно увеличивается при активации. В физиологических условиях эндотелиальная клетка секретирует ряд биологиче-

ски активных веществ, необходимых для поддержания сосудистого гомеостаза (оксид азота (NO), простагландин, эндотелин-1, ангиотензин II, тромбоксан, факторы роста и пролиферации сосудов). Поэтому в настоящее время эндотелий рассматривают как систему, способную к саморегуляции в ответ на изменения условий среды (Лупинская и др., 2008; Попова, Ваизова, 2012).

При возникновении патологических состояний и влиянии на эндотелий повреждающих факторов функции эндотелиальных клеток нарушаются, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и как следствие повышению ими синтеза молекул клеточной адгезии, селективных и провоспалительных цитокинов (Антонова и др., 2007; Ельчанинова и др., 2007; Красильникова и др., 2009; Полякова и др., 2011). Поэтому экспериментальные модели с использованием эндотелиальных клеток являются наиболее интересными и перспективными в изучении патофизиологических механизмов возникновения различных сердечно-сосудистых заболеваний.

Развитие большинства сердечно-сосудистых событий предусматривает периоды кислородного голодания. Поэтому экспериментальная модель гипоксии активно используется исследователями для изучения патогенетических механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний. При этом нарушение кровоснабжения в период гипоксии приводит к изменению функционального состояния эндотелиальных клеток. Известно, что временная гипоксия способна вызывать активацию эндотелия (Ziegelstein et al., 2003; Антонова и др., 2007), а резкое повышение содержания кислорода (реоксигенация) может оказывать как повреждающее, так и активирующее действие на эндотелиальные и прочие клетки (Forsythe et al., 1996; Bresgen et al., 2003; Ziegelstein et al., 2003; Буравкова и др., 2006; Антонова и др., 2009). Данные из литературы, касающиеся схем экспериментов при моделировании гипоксии *in vitro* и различий в соотношении газов, используемых клеток, продолжительности экспериментов и изучаемых параметров, не позволяют в полной мере ответить на все вопросы, связанные с возникновением эндотелиальной дисфункции в условиях гипоксии.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния различной степени гипоксии на пролиферативную и секреторную активность эндотелиальных клеток пупочной вены человека.

### Материал и методика

Эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (HUVES) выделяли согласно адаптированному протоколу (Jaffe et al., 1973). Последующее культивирование клеток проводили с использованием наборов Endothelial Cell Culture Medium Kit (BD Bioscience, США). В эксперименте использовали культуру HUVES 2-го пассажа, предварительно протестированную на присутствие бактериальных и вирусных ДНК, способных влиять на клеточную пролиферацию. Тестирование на микоплазму, уреоплазму, цитомегаловирус, вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (тип 16, 18), вирус простого герпеса I и II типов проводили методом ПЦР на детекторе ДТ 96 (Россия) в режиме реального времени с использованием реагентов фирмы «Амплиценс» (Россия). Используемая в эксперименте культура HUVES была свободна от бактериальных и вирусных ДНК.

Различные условия гипоксии (10 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 85 % Ar, или 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Ar, или 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 94 % Ar) создавали с помощью мультигазового биореакторного комплекса (ООО Саяны, Россия) в непрерывном 3-суточном режиме с использованием автоматической коррекции газового состава через каждые 2 мин и поддержанием температуры 37 °С в колбах биореактора. Клетки HUVES для каждого эксперимента высевали в три 6-луночных планшета в количестве 2 · 10<sup>5</sup> на 1 лунку. Предварительно лунки покрывали раствором коллагена I типа в концентрации 100 мкг/мл и помещали в первую колбу биореактора. Во вторую колбу помещали три 96-луночных планшета, лунки которых предварительно тоже были покрыты коллагеном I типа и засеяны эндотелиальными клетками в количестве 0,1 · 10<sup>5</sup> на 1 лунку. После герметизации колб запускали биореактор. Отсчет времени гипоксического воздействия начинали с момента стабилизации задаваемого газового состава (в среднем через 1,5 ч). Через каждые сутки из колб биореактора изымали по одному 6-луночному и 96-луночному план-

шету для последующего подсчета клеток, их фенотипирования, определения жизнеспособности, оценки их пролиферативной и секреторной активности после гипоксии. Смену среды в оставшихся 96-луночных планшетах проводили ежедневно, в 6-луночных — 1 раз за 3 сут.

Для определения пролиферативной активности эндотелиальных клеток в условиях гипоксии через 1, 2 и 3 сут из второй колбы биореактора вынимали по одному 96-луночному планшету с HUVES и проводили МТТ-тест с использованием МТТ Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, США). Один стрип выступал в качестве контроля культуральной среды и не содержал HUVES. Результаты МТТ-теста оценивали с помощью коэффициента пролиферации (КП) по формуле  $KP = OP_0 : OP_k$ , где OP<sub>0</sub> — оптическая плотность экстракта красителя, поглощенного эндотелиальными клетками в ходе МТТ-теста; OP<sub>k</sub> — оптическая плотность красителя, содержащегося после МТТ-теста в лунках с культуральной средой без клеток.

Контролем для всех проводимых экспериментов служили эндотелиальные клетки, культивированные 3 сут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в присутствии атмосферного кислорода (21 %). Посев в 6- и 96-луночные планшеты и оценку результатов проводили по той же схеме, что и при различной гипоксии.

Подсчет эндотелиальных клеток после снятия с поверхности культурального пластка 0,5%-ным раствором трипсина (Sigma-Aldrich, США) проводили в камере Горяева. Фенотип снятых HUVES определяли методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител против CD146 и CD34 (BD Biosciences, США), меченных флуорохромами. Жизнеспособность HUVES оценивали методом проточной цитофлуориметрии, определяя число жизнеспособных HUVES, а также пребывающих в состоянии раннего, позднего апоптоза и некроза. Для этой цели использовали комбинированную окраску с помощью аннексина V, меченного фикоэритрином (PE), и ДНК-связывающего красителя 7-AAD (BD Biosciences, США). Окрашивание проводили по инструкции фирмы-производителя. Клетки в состоянии апоптоза определялись за счет высокоаффинного связывания аннексина с фосфатидилсеринем, появляющимся на внешнем монослое цитоплазматической мембраны. Дополнительная окраска 7-AAD позволила выделить раннюю и позднюю стадии клеточного апоптоза и идентифицировать некроз.

Определение уровня базальной секреции эндотелиальных клеток при различной степени оксигенации осуществляли по наличию в среде культивирования веществ, синтезируемых эндотелием. Количественное определение оксида азота осуществляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа по суммарному содержанию его стойких метаболитов (ионов NO<sup>-2</sup> и NO<sup>-3</sup>) в среде культивирования HUVES. В основе метода лежит ферментативная конверсия нитратов и нитритов нитратредуктазой с последующим колориметрическим определением продуктов реакции Грисса. Процедура определения метаболитов оксида азота проводили согласно инструкции фирмы-производителя тест-системы (R&D Systems, Inc. США). Эндотелин-1 (1-21), фактор фон Виллебрандта, IL-6, IL-8 и TNF-α, молекулы клеточной адгезии sVCAM-1, sE-кадгерин, sE-селектин, VEGF-A и bFGF определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирм Bioscience, R&D

Systems, Invitrogen, American Diagnostica Inc. (США), Biomedica Gruppe (Австрия). Вследствие различия скорости пролиферации HUVEC при культивировании в условиях различной оксигенации расчет концентраций определяемых веществ проводили на 1 жизнеспособную клетку через 1, 2 и 3 сут эксперимента.

Анализируемые показатели имели не нормальное распределение, поэтому достоверность различий определяли с помощью непараметрических критериев. Для оценки достоверности различий трех и более показателей внутри одной группы использовали критерий Фридмана, при проведении попарных сравнений — критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони. Для оценки достоверности корреляционных зависимостей между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмана. Данные представляли как медиана и 25 и 75 % квартили (Me (25 %; 75 %)). При всех видах статистического анализа уровень значимости составлял 95 % ( $P < 0.05$ ). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

### Результаты

Перед началом эксперимента доля жизнеспособных клеток HUVEC составляла 93.5 %, раннеапоптотических — 3.15, позднеапоптотических — 2.79 и некротиче-

ских — 0.56 %. Из числа жизнеспособных ЭК 97.7 % имели фенотип CD146<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>.

Спустя 3 сут культивирования HUVEC в присутствии атмосферного кислорода, а также при снижении кислорода в газовой среде культивирования до 10 или 5 % клеточный фенотип и количество жизнеспособных клеток не изменялись. Однако наметилась тенденция перераспределения долевого соотношения клеток, пребывавших в состоянии раннего, позднего апоптоза и некроза: происходило уменьшение клеток в состоянии раннего апоптоза за счет более часто встречаемых позднеапоптотических и некротических клеток (рис. 1, а—в). Максимум подобных изменений выявлен через 3 сут культивирования HUVEC при 1 % O<sub>2</sub> (рис. 1, г). Доля клеток, находившихся на пути запрограммированной гибели, составила 41.6 %. Среди апоптотически измененных HUVEC преобладали клетки в состоянии позднего апоптоза — 36.2 %. При этом жизнеспособными оставались лишь 55.4 % ЭК.

Динамика пролиферации HUVEC при различной оксигенации (рис. 2) свидетельствует о том, что общее количество клеток и коэффициенты пролиферации спустя 3 сут культивирования при атмосферном кислороде, а также при содержании его в газовой среде 10 и 5 % не отличались друг от друга. При этом самая низкая пролиферативная активность клеток выявлена при культивировании в присутствии 1 % O<sub>2</sub>. В этом случае общее количество HUVEC через 3 сут культивирования оказалось

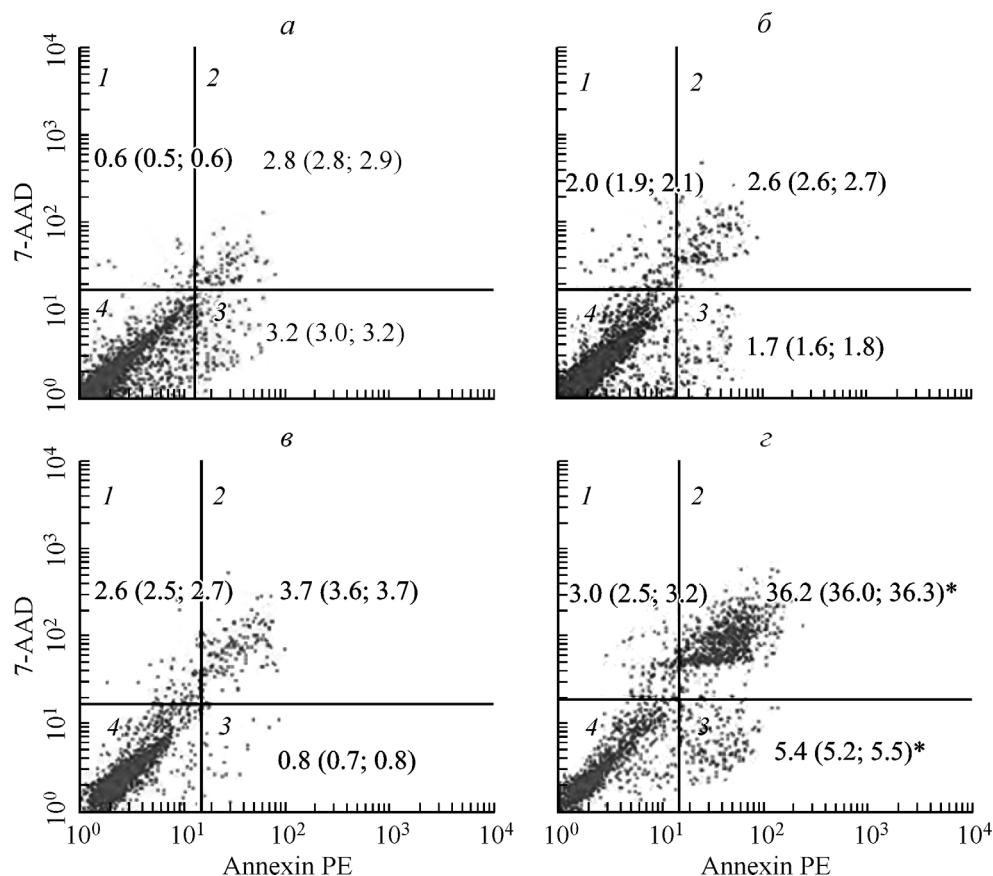


Рис. 1. Двухмерные гистограммы, отражающие жизнеспособность и интенсивность апоптоза и некроза HUVEC через 3 сут культивирования при содержании кислорода в газовой среде культивирования 21 (а), 10 (б), 5 (в) и 1 (г) %.

По горизонтали — интенсивность флуоресценции аннексина-V, конъюгированного с фикоэритрином (PE); по вертикали — интенсивность флуоресценции 7-AAD. Квадранты 1—4 — доля клеток в состоянии некроза, позднего апоптоза, раннего апоптоза и жизнеспособных клеток соответственно; звездочкой показана достоверность отличия от остальных данных,  $P < 0.05$ . Здесь и на всех рисунках результаты представлены как медиана и 25 и 75 % квартили ((Me (25 %; 75 %), n = 6).

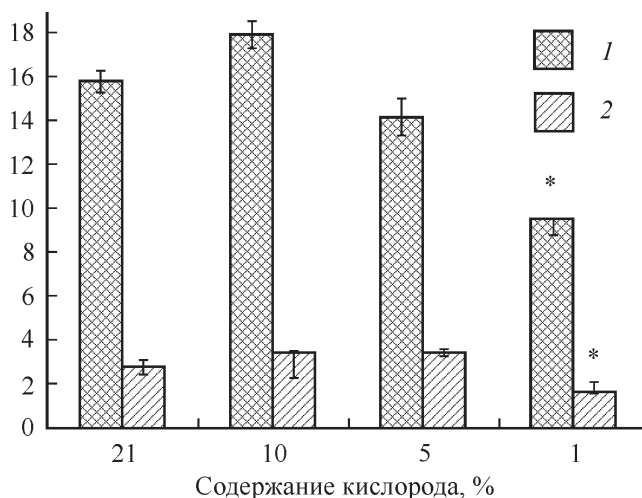


Рис. 2. Проллиферативная и метаболическая активность HUVEC через 3 сут культивирования при различной оксигенации.

По вертикали — количество клеток HUVEC (1) и коэффициент пролиферации (2), отн. ед.; звездочкой показана достоверность отличия от остальных данных,  $P < 0.05$ .

в 1.9 и 1.5 раза меньше, чем при культивировании в присутствии 10 и 5 %  $O_2$  соответственно, и в 1.7 раза меньше, чем при культивировании в  $CO_2$ -инкубаторе в присутствии атмосферного кислорода ( $P < 0.05$ ). КП был в 2.1 раза ниже, чем при культивировании клеток в присутствии 10 или 5 %  $O_2$ , и в 1.7 раза ниже, чем при культивировании HUVEC в условиях атмосферного кислорода. Следует отметить, что нарастание клеточной массы коррелировало с увеличением КП только в течение 1-х сут культивирования при содержании  $O_2$  1 % ( $r = 0.998$ ). Спустя 3 сут картина кардинально менялась и пролиферативная активность HUVEC явно снижалась на фоне умеренного нарастания КП, отражавшего напряженность клеточного метаболизма ( $r = -0.996$ ). Все это свидетельствует о явных изменениях метаболической активности HUVEC при снижении кислорода в газовой среде до 1 %  $O_2$ .

Секреция HUVEC. Наивысшие концентрации всех синтезируемых эндотелиоцитами веществ (в перерасчете на 1 жизнеспособную клетку) при различной оксигенации были зарегистрированы спустя 1 сут культивирования. Подобную активацию HUVEC мы связываем с адаптацией клеток к измененным условиям культивирования, а также с ответом на предшествующую трипсинизацию клеток в процессе их пересевания. Поэтому результаты секреторной активности эндотелия как минимум в 1-е сут после начала эксперимента, на наш взгляд, не отражают истинного состояния обмена веществ клетки и не должны включаться в статистический анализ. Таким образом, статистической обработке подвергнуты данные, полученные спустя 2 и 3 сут культивирования.

Все вещества, синтезируемые эндотелием, можно разделить на 5 классов: 1) вазоактивные соединения (вазодилаторы и вазоконстрикторы); 2) про- и антикоагулянты; 3) медиаторы воспаления; 4) вещества, принимающие участие в иммунологических реакциях (молекулы межклеточной адгезии); 5) факторы роста. Поэтому полученные результаты мы разделили на 5 соответствующих групп по следующим параметрам: 1) динамика нитритов и суммарного содержания стойких метаболитов NO (ионов  $NO^{-2}$  и  $NO^{-3}$ ), динамика эндотелина-1; 2) динамика фактора фон Виллебрандта; 3) динамика провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ ; 4) динамика sVCAM-1, sE-кадгерина и sE-селектина; 5) динамика VEGF-A и bFGF.

Группа 1. Одним из основных вазодилатирующих веществ, вырабатываемых эндотелием сосудистой стенки, является NO. Известно, что NO имеет очень короткий период полураспада, поэтому мы ориентировались на конечные продукты его восстановления — нитриты, в которые превращаются нитраты под влиянием нитратредуктазы (Rassaf et al., 2004). Так, нами выявлено, что значения содержания нитритов спустя 2 сут культивирования при 10 и 5 %  $O_2$  (0.56 (0.53; 0.59) мкмоль/л) и 0.43 (0.28; 0.64) мкмоль/л соответственно) статистически не различались и были наименьшими среди всех рассматриваемых групп. Концентрация нитритов через 2 сут культиви-

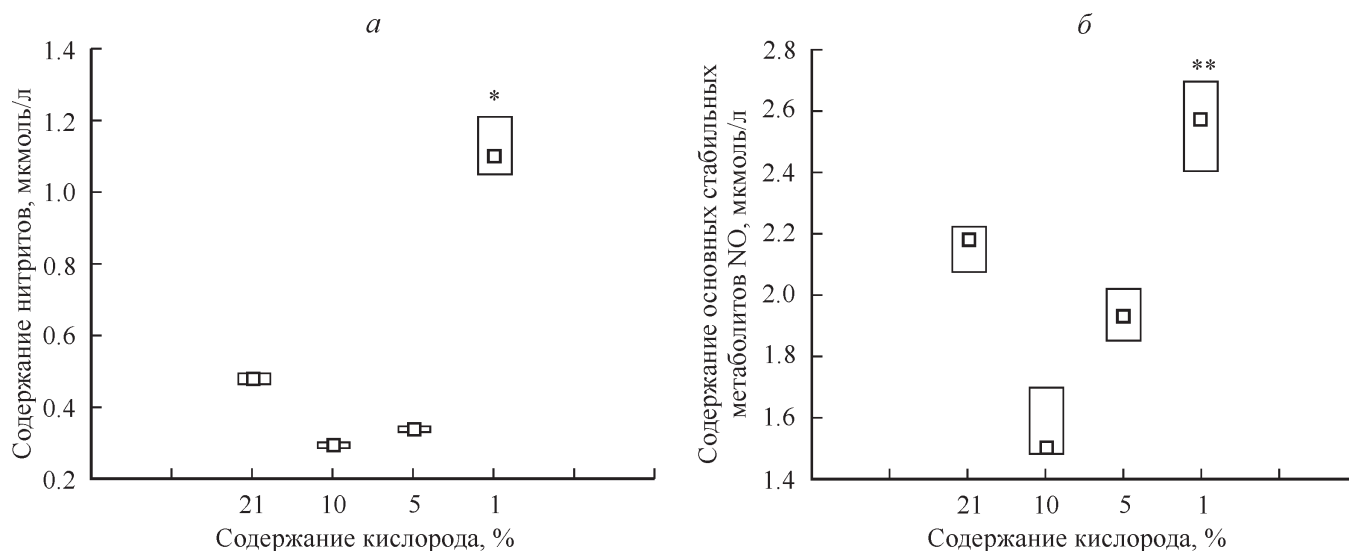


Рис. 3. Содержание нитритов (а) и основных стабильных метаболитов NO (б) через 3 сут культивирования HUVEC при различной оксигенации.

Одной звездочкой показана достоверность отличия от случаев с содержанием  $O_2$  21, 10 и 5 %; двумя звездочками — от случаев с содержанием  $O_2$  10 и 5 %,  $P < 0.05$ .

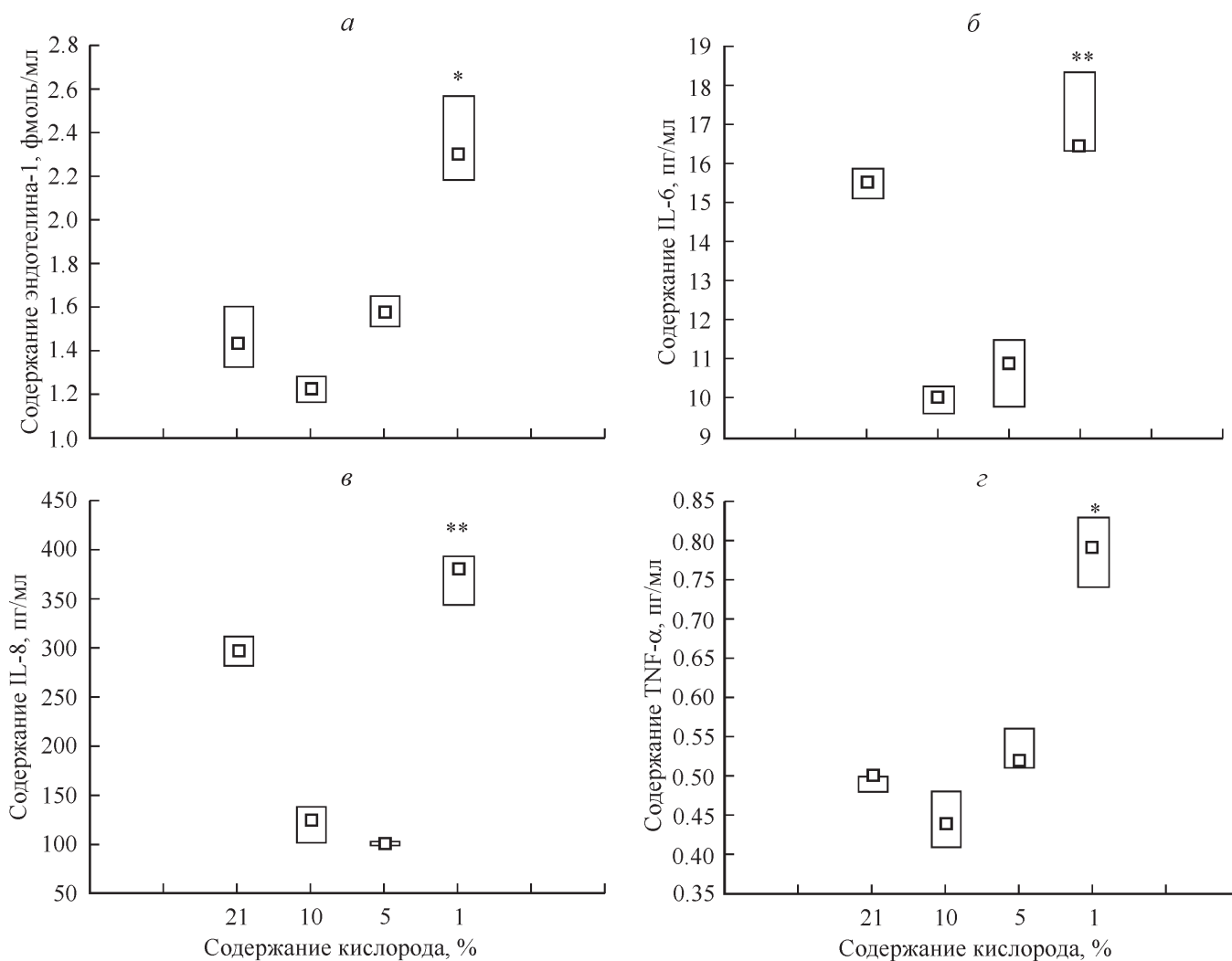


Рис. 4. Содержание эндотелина-1 (а) и провоспалительных цитокинов IL-6 (б), IL-8 (в) и TNF-α (г) через 3 сут культивирования HUVEC при различной оксигенации.

Одной звездочкой показана достоверность отличия от случаев с содержанием O<sub>2</sub> 21, 10 и 5 %; двумя звездочками — от случаев с содержанием O<sub>2</sub> 10 и 5 %, P < 0.05.

рования HUVEC при содержании O<sub>2</sub> 1 % (1.37 (1.33; 1.47) мкмоль/л) была в 2.5 и 3 раза выше, чем при 10 и 5 % O<sub>2</sub> соответственно, и в 1.3 раза выше, чем в контрольной группе (1.09 (0.91; 1.32) мкмоль/л). Через 3 сут культивирования (рис. 3, а) самые низкие значения нитритов вновь зарегистрированы при культивировании в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub> (0.29 (0.28; 0.3) мкмоль/л) и (0.34 (0.34; 0.35) мкмоль/л) соответственно, что оказалось в 3.8 и 3.2 раза ниже, чем уровень нитритов при культивировании в присутствии 1 % O<sub>2</sub> (1.1 (1.05; 1.21) мкмоль/л). При этом концентрация нитритов в контроле через 3 сут культивирования была в 2.3 раза ниже, чем в клетках при 1 % O<sub>2</sub>, снизившись вдвое (0.48 (0.47; 0.49) мкмоль/л).

Концентрации нитратов через 2 сут культивирования клеток закономерно снижались по мере снижения содержания кислорода в газовой среде культивирования, оказавшись наименьшими при содержании O<sub>2</sub> 1 % (1.81 (1.78; 1.92) мкмоль/л). В это же время в контрольной группе содержание нитратов было в 2.3 раза выше (4.13 (3.76; 4.65) мкмоль/л), при 10 % O<sub>2</sub> — в 1.4 раза выше (2.47 (2.19; 2.75) мкмоль/л), а при 5 % O<sub>2</sub> — в 1.8 раза выше (3.2 (2.99; 3.48) мкмоль/л), чем при 1 % O<sub>2</sub>. Через

3 сут культивирования HUVEC при различной оксигенации тенденция сохранялась, и самые низкие значения нитратов (1.47 (1.34; 1.48) мкмоль/л) зарегистрированы при содержании O<sub>2</sub> 1 %, которые, однако, статистически не отличались от значений при прочих условиях. Соответственно суммарное содержание основных стабильных метаболитов NO (ионов NO<sup>-2</sup> и NO<sup>-3</sup>) к окончанию 3-х сут культивирования HUVEC в условиях гипоксии разной степени (рис. 3, б) превалировало при 1 % O<sub>2</sub> (2.57 (2.4; 2.69) мкмоль/л) и было в 1.2 раза выше соответствующего значения контрольной группы (2.18 (2.08; 2.22) мкмоль/л) и в среднем в 1.5 раза выше значений при культивировании клеток в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub>.

У эндотелина-1 была похожая динамика. Через 2 сут наивысшие концентрации эндотелина-1 обнаружены при культивировании HUVEC в условиях атмосферного кислорода (4.02 (3.61; 4.35) фмоль/мл), что оказалось выше, чем при содержании O<sub>2</sub> 1 % (3.61 (3.45; 3.95) фмоль/мл). На этом фоне синтез эндотелина-1 в клетках в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub> (2.83 (2.68; 2.9) и 2.24 (1.92; 2.53) фмоль/мл соответственно) был в 1.4 и 1.8 раза ниже, чем в контрольной группе, и соответственно в 1.3 и 1.6 раза

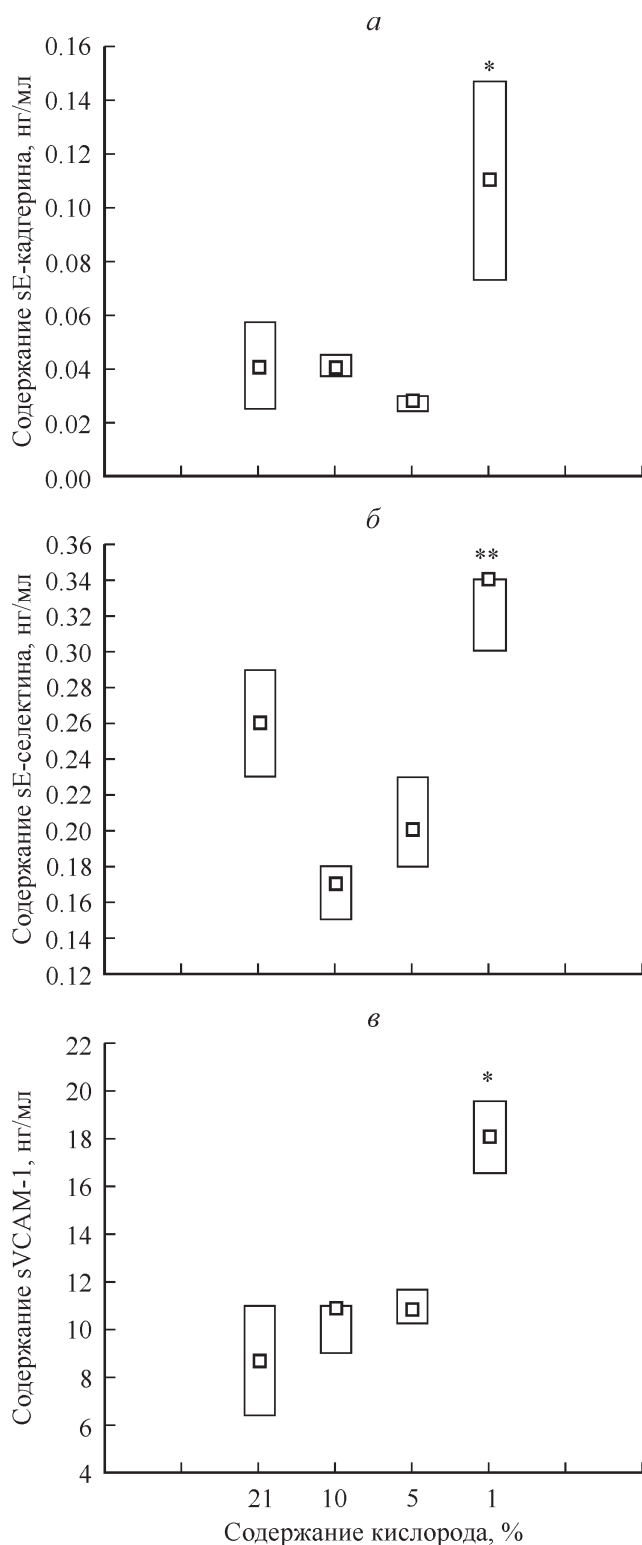


Рис. 5. Уровень молекул клеточной адгезии sE-кадгерина (а), sE-селектина (б) и sVCAM-1 (в) через 3 сут культивирования HUVEC при различной оксигенации.

Одной звездочкой показана достоверность отличия от случаев с содержанием O<sub>2</sub> 21, 10 и 5 %; двумя звездочками — от случаев с содержанием O<sub>2</sub> 10 и 5 %,  $P < 0.05$ .

ниже, чем при культивировании HUVEC в присутствии 1 % O<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). Спустя 3 сут культивирования синтез эндотелина-1 в контрольной группе (1.43 (1.32; 1.6) фмоль/мл) значительно снизился по сравнению с предыдущим периодом, что привело к отсутствию значимых различий со значениями эндотелина-1 в случае 10 и 5 % O<sub>2</sub> (1.22 (1.16; 1.28) фмоль/мл и 1.57 (1.51; 1.65) фмоль/мл соответственно) в это время (рис. 4, а). И только в случае культивирования клеток при 1 % O<sub>2</sub> уровень эндотелина-1 (2.3 (2.18; 2.56) фмоль/мл) продолжал оставаться выше, чем в других условиях.

Таким образом, наиболее комфортными условиями культивирования для HUVEC явилась газовая среда, содержащая 10 и 5 % кислорода, в которой эндотелиоциты пребывали в состоянии максимального функционального покоя. Снижение концентрации кислорода до 1 % привело к стимуляции образования нитритов и эндотелина-1, что может быть отражением адаптационно-компенсаторной реакции эндотелия на снижение содержания кислорода.

**Группа 2.** Основная функция фактора фон Виллебранда в организме — участие в адгезии и агрегации тромбоцитов на поверхности субэндотелия и образовании фибринового сгустка. В ходе наших экспериментов при различной гипоксии эндотелиальные клетки не вырабатывали фактор фон Виллебранда. И только в контрольной группе этот фактор присутствовал на всех этапах культивирования, через 3 сут его значение составляло 0.22 (0.17; 0.26) %.

**Группа 3.** При культивировании HUVEC в CO<sub>2</sub>-инкубаторе и в присутствии 1 % O<sub>2</sub> синтез провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ ) был наиболее динамичным. Самые высокие концентрации IL-6 (рис. 4, б) выявлены через 3 сут культивирования клеток при содержании O<sub>2</sub> 1 и 21 % (16.42 (16.3; 18.29) и 15.5 (15.11; 15.85) пг/мл соответственно). Концентрации IL-6 в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub> (10.1 (9.65; 10.3) и 11.2 (9.78; 11.4) пг/мл соответственно) в это время не различались между собой, но были в 1.5 раза ниже, чем при 1 % O<sub>2</sub> и в контроле.

Динамика IL-8 была схожа с динамикой IL-6: через 3 сут культивирования максимальные значения IL-8 зарегистрированы при культивировании HUVEC в присутствии 1 и 21 % O<sub>2</sub> (рис. 4, в). Однако концентрация IL-8 при 3-суточном культивировании в условиях 1%-ного O<sub>2</sub> (378.5 (342.4; 391.3) пг/мл) оказалась в 1.3 раза выше, чем в контроле (295.2 (279.8; 310.6) пг/мл). Синтез IL-8 в условиях содержания O<sub>2</sub> 10 и 5% был менее выраженным. Через 3 сут культивирования HUVEC при 10 % O<sub>2</sub> уровень IL-8 оказался в 1.3 раза выше (124.3 (102.0; 138.4) пг/мл), чем при 5 % O<sub>2</sub> (98.4 (97.9; 102.0) пг/мл). Тем не менее это значение в 2.4 раза ниже, чем в контрольной группе, и в 3 раза ниже, чем при культивировании эндотелиоцитов в присутствии 1 % O<sub>2</sub>.

Синтез эндотелиоцитами TNF- $\alpha$  в различные временные периоды культивирования вновь превалировал в условиях 1 и 21 % O<sub>2</sub>. Так, через 2 сут культивирования концентрация TNF- $\alpha$  в контрольной группе (1.48 (1.38; 1.6) пг/мл) была в 1.3 раза выше, чем в случае 1 % O<sub>2</sub> (1.14 (1.1; 1.3) пг/мл). Однако спустя 3 сут культивирования содержание TNF- $\alpha$  в контроле снизилось до 0.5 (0.48; 0.5) пг/мл и стало в 1.6 раза меньше, чем в случае 1 % O<sub>2</sub> (0.79 (0.74; 0.83) пг/мл). Наименьший синтез TNF- $\alpha$  был зарегистрирован при культивировании клеток в присутствии 5 % O<sub>2</sub>. Спустя 2 сут культивирования уровень TNF- $\alpha$  (0.73 (0.62; 0.86) пг/мл) был в 1.5 раза ниже, чем в

присутствии 10 % O<sub>2</sub> в это же время (1.07 (0.92; 1.09) пг/мл). Через 3 сут культивирования HUVEC при 10 % O<sub>2</sub> произошло двукратное снижение концентрации этого цитокина (0.44 (0.41; 0.48) пг/мл) с нивелированием разницы по этому показателю, как с контролем, так и с вариантом содержания O<sub>2</sub> 5 % (рис. 4, з). При этом значения TNF-α были в среднем в 1.5 раза ниже, чем после 3-суточного культивирования в присутствии 1 % O<sub>2</sub>. Таким образом, динамика провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF-α свидетельствует о повышении провоспалительной активности HUVEC как при критичном снижении концентрации кислорода в культивируемой зоне (до 1 %), так и при культивировании по стандартному в настоящее время протоколу для клеток различных типов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в присутствии атмосферного кислорода.

**Группа 4.** Уровень sE-кадгерина в клетках течение 3-суточной гипоксии постепенно снижался. Такая же динамика наблюдалась и в контроле. И только при культивировании HUVEC в условиях 1%-ного содержания O<sub>2</sub> уровень sE-кадгерина оказался выше на всех этапах культивирования. Так, через 2 сут при 1 % O<sub>2</sub> концентрация sE-кадгерина в среде культивирования (0.11 (0.065; 0.165) нг/мл) была в 1.7 раза выше, чем в стандартных условиях культивирования (0.056 (0.05; 0.063) нг/мл). Через 3 сут (рис. 5, а) эта разница увеличивалась до 2.8 раза,  $P < 0.05$ . Через 3 сут культивирования HUVEC в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub> уровень sE-кадгерина оказался соответственно в 2.8 (0.04 (0.037; 0.05) нг/мл) и 3.9 (0.028 (0.024; 0.03) нг/мл) раза ниже, чем при культивировании в условиях 1%-ного содержания O<sub>2</sub> (0.11 (0.073; 0.147) нг/мл).

Схожая динамика была и у sE-селектина (рис. 5, б). Через 3 сут культивирования клеток его наибольшая концентрация также зарегистрирована в случае 1 % O<sub>2</sub> (0.34 (0.3; 0.34) нг/мл), что в 1.3 раза выше, чем в контрольной группе (0.26 (0.23; 0.29) нг/мл), в 2 и 1.7 раза выше, чем в случае 10 (0.17 (0.15; 0.18) нг/мл) и 5 % O<sub>2</sub> (0.2 (0.18; 0.23) нг/мл) соответственно. При этом значения концентраций sE-селектина между случаями с 10- и 5%-ным содержанием O<sub>2</sub> не различались. Однако следует отметить, что снижение концентрации sE-селектина в культивационной среде при использовании 5 % O<sub>2</sub> шло гораздо интенсивнее, и уже спустя 2 сут уровень sE-селектина был в этом случае в 2.4 раза ниже, чем в случае 10 % O<sub>2</sub>.

Максимальная концентрация sVCAM-1 (рис. 5, в) зафиксирована через 3 сут культивирования HUVEC при 1 % O<sub>2</sub> (18.1 (16.6; 19.6) нг/мл), что в 2.1 раза выше, чем в контроле (8.7 (6.4; 11.0) нг/мл). Однако это редкий случай, когда показатель в контроле ниже, чем в случаях с условно комфортным для HUVEC содержанием кислорода — 10 (10.9 (9.0; 11.0) нг/мл) и 5 % (10.8 (10.3; 11.7) нг/мл), хотя этот факт не был статистически значимым ( $P > 0.05$ ).

Таким образом, стабильность обмена веществ в эндотелиальных клетках при культивировании в условиях содержания O<sub>2</sub> 10 и 5 % свидетельствует об отсутствии эндотелиальной дисфункции. Дестабилизацию метаболизма клеток при 1 % O<sub>2</sub> вплоть до развития эндотелиальной дисфункции подтверждает помимо высокого уровня провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии наличие только в этом случае сильной корреляции между уровнями IL-8 и sE-селектина ( $r = 0.866$ ).

**Группа 5.** (рис. 6, а), Через 3 сут культивирования HUVEC содержание ростового фактора VEGF-A в среде культивирования в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub>, а также в контроле не различалось, составляя соответственно 0.2

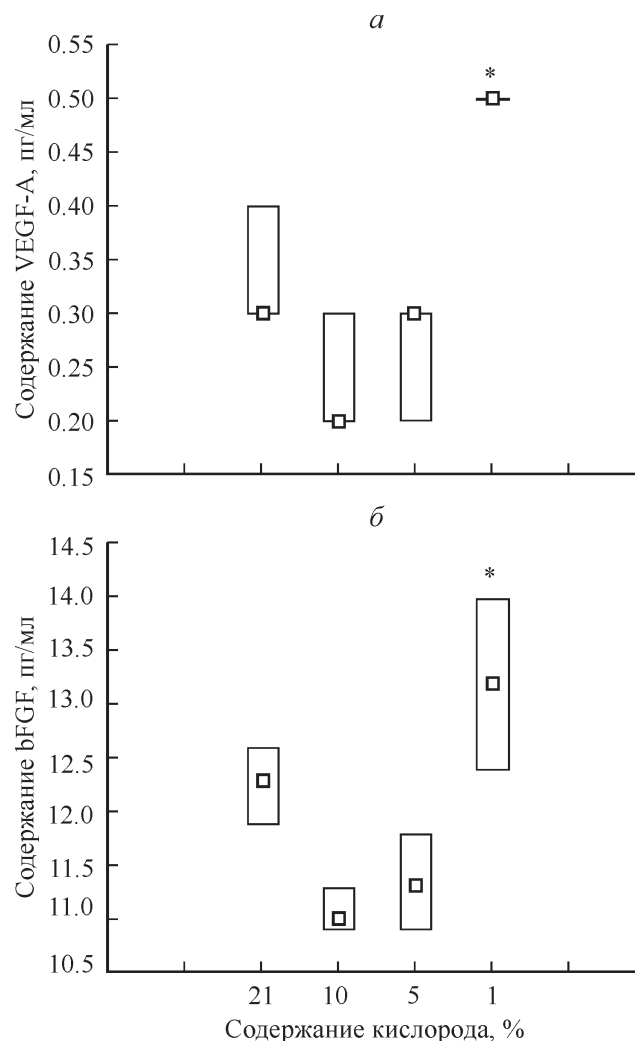


Рис. 6. Содержание ростовых факторов VEGF-A (а) и bFGF (б) через 3 сут культивирования HUVEC при различной оксигенации.

Звездочкой показана достоверность отличия от случаев с содержанием O<sub>2</sub> 21, 10 и 5 %,  $P < 0.05$ .

(0.2; 0.3), 0.3 (0.2; 0.3) и 0.3 (0.3; 0.4) пг/мл,  $P > 0.05$ . При этом через 3 сут культивирования клеток при 1 % O<sub>2</sub> уровень VEGF-A был в среднем в 1.7 раза выше (0.5 (0.5; 0.55) пг/мл), чем в прочих группах,  $P < 0.05$ . Значения содержания для фактора bFGF в случае 10 и 5 % O<sub>2</sub> и контроле через 3 сут культивирования HUVEC (рис. 6, б) были практически одинаковы: 11.0 (10.9; 11.3), 11.3 (10.9; 11.8) и 12.3 (11.9; 12.6) пг/мл соответственно. При этом они оказались в 1.2 раза ниже, чем в случае 1 % O<sub>2</sub> в это же время (13.2 (12.4; 14.0) пг/мл).

### Обсуждение

Известно, что в спокойном (базальном) состоянии эндотелия преобладают вазодилатирующие и атромбогенные свойства. Наиболее сильным стимулом для продукции NO служит напряжение сдвига, связанное с увеличением скорости кровотока и вызывающее расслабление, пропорциональное вырабатываемому количеству NO. В результате различных патологических процессов эндотелий переходит в активное состояние. Оказываемое на

эндотелий цитотоксическое действие (любой этиологии) смещает баланс вырабатываемых эндотелием веществ в сторону синтеза вазоконстрикторов и прокоагулянтов, усиления провоспалительной активности, синтеза клеточных факторов роста, выработки адгезивных молекул и селективных и в итоге приводит к дисфункции эндотелия (Лупинская и др., 2008; Уразовская и др., 2009). Большое количество исследований указывает на то, что гипоксия — один из мощных факторов, способных изменить метаболизм эндотелиальных клеток вплоть до развития эндотелиальной дисфункции (Natarajan et al., 2003; Hickey, Simon, 2006; Fong, 2008). Общеизвестными циркулирующими маркерами эндотелиальной дисфункции являются эндотелин, фактор фон Виллебранда, молекулы клеточной адгезии и провоспалительные цитокины. При этом синтез провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии подтверждает наличие эндотелиальной дисфункции, так как в условиях стабильности клеточного обмена и отсутствия внешних раздражающих факторов синтез этих молекул отсутствует (Писаржевский, 2005; Лупинская и др., 2008).

Полученные нами результаты по изменению секреторной активности эндотелиальных клеток HUVEC при культивировании не только в условиях сниженного содержания кислорода (1 %), но и при стандартных условиях (при атмосферном уровне кислорода) позволяют констатировать активацию эндотелиоцитов, которая превышает базальную секрецию в клетках в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub>. Так, повышение продукции оксида азота, провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, TNF-α и фактора фон Виллебранда при культивировании в стандартных условиях указывает на явную активацию клеток, в то время как их уровень при культивировании HUVEC в присутствии 10 или 5 % кислорода наименьший. Полученные результаты коррелируют с повышением пролиферативной активности HUVEC в присутствии 10 и 5 % O<sub>2</sub>. Все это свидетельствует о возможном искажении истинной функциональной активности эндотелиальных клеток в экспериментах, проводимых в условиях стандартного протокола культивирования.

Однако комплексная оценка результатов 3-суточного культивирования HUVEC в присутствии 1 % O<sub>2</sub> позволяет констатировать патологическую активацию эндотелиоцитов, поскольку уровень секреции всех изученных нами веществ максимален. Повышенный синтез NO, сочетающийся с выраженной секрецией эндотелина-1, IL-6, IL-8 и TNF-α, sVCAM-1, sE-кадгерина и sE-селектина, отражает классическую эндотелиальную дисфункцию. Корреляционная зависимость между уровнями IL-8 и молекулами клеточной адгезии в случае 1 % O<sub>2</sub> свидетельствует об усилении синтеза sE-селектина в ответ на увеличение содержания IL-8.

Известно, что гипоксия является сильным стимулятором синтеза факторов роста (Forsythe et al., 1996). Это обусловлено тем, что реакция на гипоксию компенсаторная, так как в условиях гипоксии адаптация органов возможна только при увеличении сосудистой сети для сохранения объема притока кислорода. Полученные нами результаты продемонстрировали активацию синтеза факторов VEGF-A и bFGF при культивировании клеток в условиях 1 % O<sub>2</sub>, что может отражать готовность эндотелиоцитов к образованию новых сосудов при снижении уровня кислорода до критического значения.

Известно, что в культивируемых клетках эндотелия 95 % синтезируемого фактора фон Виллебранда упаковано в хранилища, именуемые тельцами Вейбеля-Палада.

Увеличение содержания этого фактора *in vivo* является одним из ранних событий запуска образования тромбоцитарной пробки, т. е. активации процессов тромбообразования (Шушляпин и др., 2006). Появление фактора фон Виллебранда в эндотелиальных клетках в условиях атмосферного кислорода и его полное отсутствие при культивировании клеток в условиях гипоксии различной степени может свидетельствовать о том, что в наших экспериментах *in vitro* критическое снижение кислорода способствует прежде всего запуску неоваскулогенеза, осуществляемого через активацию синтеза ростовых факторов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее физиологическими условиями культивирования клеток HUVEC является газовая среда, содержащая пониженное до 5 % содержание кислорода. Комфортность для HUVEC этого газового состава подтверждается их максимальной пролиферативной активностью при минимальной базальной секреции. Повышение уровня кислорода до атмосферного приводит к активации эндотелиоцитов с признаками развивающейся эндотелиальной дисфункции, а критическое снижение кислорода до 1 % вызывает развитие эндотелиальной дисфункции и снижает пролиферативный потенциал.

Авторы выражают благодарность за сотрудничество коллективу кафедры акушерства и гинекологии № 2 ГОУ ВПО Кемеровской государственной медицинской академии Минздравсоцразвития РФ во главе с проф. Н. В. Артымук.

#### Список литературы

- Антонова О. А., Локтионова С. А., Голубева Н. В., Романов Ю. А., Мазуров А. В. 2007. Повреждение и активация эндотелиальных клеток при гипоксии *in vitro*. Бюл. эксперим. биол. мед. 144 (10) : 384—386. (Antonova O. A., Loktionova S. A., Golubeva N. V., Romanov Yu. A., Mazurov A. V. 2007. Damage and activation of endothelial cells during *in vitro* hypoxia. Bull. Exp. Biol. Med. 144 (10) : 384—386.)
- Антонова О. А., Локтионова С. А., Шустова О. Н., Голубева Н. В., Мазуров А. В. 2009. Действие гипоксии и реоксигенации на культивируемые эндотелиальные клетки человека. Кардиологический вестник. 4 (2) : 12—17. (Antonova O. A., Loktionova S. A., Shustova O. N., Golubeva N. V., Mazurov A. V. 2009. Effects of hypoxia and reoxygenation on human cultured endothelial cells. Vest. of Cardiol. 4 (2) : 12—17.)
- Буравкова Л. Б., Гринаковская О. С., Мерзликina Н. В. 2006. Влияние гипероксических газовых смесей на пролиферативную и миграционную активность культивируемых эндотелиальных клеток человека. Авиакосм. и экол. мед. 3 : 38—42. (Buravkova L. B., Grinakovskaya O. S., Merzlikina N. V. 2006. Effects of hyperoxic gas mixtures on the proliferative and migrative activities of cultivated endothelial cells of humans. Aerosp. and Envir. Med. 3 : 38—42.)
- Ельчанинова С. А., Кореньяк Н. А., Дрягина И. В., Макаренко В. В., Смирнова О. И. 2007. Маркеры повреждения эндотелия как возможный критерий эффективности лечения артериальной гипертензии. Клин. лаб. диагн. 2 : 40—42. (Elchaninova S. A., Korenyak N. A., Dryagina I. V., Makarenko V. V. 2007. Endothelial injury markers as a possible criterion for the efficiency of treatment for arterial hypertension. Klin. Lab. Diagn. 2 : 40—42.)
- Ефименко А. Ю., Старостина Е. Е., Рубина К. А., Калинин Н. И., Парфенова Е. В. 2010. Влияние гипоксии и воспалительных факторов на жизнеспособность и ангиогенную активность мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани и



костного мозга. Цитология. 52 (2) : 144—154. (Efimenko A. Yu., Starostina E. E., Rubina K. A., Kalinina N. I., Parfenova E. V. 2010. Viability and angiogenic activity of mesenchymal stromal cells from adipose tissue and bone marrow under hypoxia and inflammation *in vitro*. Cell Tis. Biol. 4: 117—127.)

Красильникова Е. И., Нифонтов Е. М., Сергеева Е. Г., Антонова Т. В., Жлоба А. А., Галкина О. В., Романова М. А. 2009. Показатели адгезионной дисфункции эндотелия и факторы иммунного воспаления у больных гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца: динамика на фоне терапии крестором. Артериальная гипертензия. 15 (3) : 268—274. (Krasilnikova E. I., Nifontov E. M., Sergeeva E. G., Antonova T. V., Zhloba A. A., Galkina O. V., Romanova M. A. 2009. Adhesion endothelial dysfunction and immune inflammatory factors in hypertensive patients with coronary heart disease: effects of rosuvastatin. Arter. Hypertens. 15 (3) : 268—274.)

Лупинская З. А., Зарифьян А. Г., Гурович Т. Ц., Шлейфер С. Г. 2008. Эндотелий. Функция и дисфункция. Бишкек: КРСУ. 373 с. (Lupinskaya Z. A., Zarifyan A. G., Gurovich T. Z., Shleipher S. G. 2008. Endothelium: function and dysfunction. Bishkek. KRSU. 373 p.)

Писаржевский С. А. 2005. Проницаемость эндотелия и атеросклероз. Кардиология. 12 : 27—42. (Pisarghevskiy S. A. 2005. The endothelial permeability and atherosclerosis. Kardiologiya. 12 : 27—42.)

Полякова А. П., Блинов М. Н., Каргин В. Д., Капустин С. И. 2011. Молекулярные механизмы эндотелиальной дисфункции при венозном тромбозе: современные представления и перспективы дальнейшего изучения. Трансфузиология. 12 : 1248—1265. (Polyakova A. P., Blinov M. N., Kargin V. D., Kapustin S. I. 2011. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction in venous thromboembolism: the present state and perspectives of investigation. Transfusiology. 12 : 1248—1265.)

Попова Л. А., Ваизова О. Е. 2012. Современные представления о сосудистом эндотелии с позиции общей теории систем. Фундаментальные исследования. 2 (2) : 328—332. (Popova L. A., Vaizova O. E. 2012. Modern view of vascular endothelium in terms of general system theory. Fund. Rec. 2 (2) : 328—332.)

Солодовникова И. М., Сапрунова В. Б., Бакеева Л. Е., Ягузинский Л. С. 2006. Динамика изменений ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированного миокарда крысы при длительной инкубации в условиях аноксии. Цитология. 48 (10) : 848—855. (Solodovnikova I. M., Saprunova V. B., Bakeeva L. E., Yagujinsky L. S. 2006. Dynamics of mitochondrial ultrastructure in small pieces of cardiac tissue under long-term anoxic incubation. Tsitologiya. 48 (10) : 848—855.)

Старикова Э. А., Лебедева А. М., Бурова Л. А., Фрейдлин И. С. 2012. Изменения функциональной активности эндо-

телиальных клеток под влиянием лизата. Цитология. 54 (1) : 49—57. (Starikova E. A., Lebedeva A. M., Burova L. A., Freidlin I. S. 2012. Alteration in the endothelial cell functional activity by the *Streptococcus pyogenes* ultrasonic lysate. Cell Tissue. Biol. 6: 154—161.)

Уразовская И. Л., Виноградова Д. А., Скрыпник Д. В., Васильева Е. Ю., Шнектор А. В. 2009. Дисфункция эндотелия у больных с острым коронарным синдромом. Креативная кардиол. 1 : 50—54. (Urazovskaya I. L., Vinogradova D. A., Skripnik D. V., Vasiljeva E. Yu., Shpektor A. V. 2009. Endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndrome. Creative Cardiol. 1 : 50—54.)

Шушляпин О. И., Кононенко Л. Г., Манник И. М. 2006. Фактор Виллебранда и его роль в дисфункции эндотелия при ишемической болезни сердца: диагностика, критерии прогноза и перспективные подходы к терапии. Укр. кардиол. журн. 3 : 126—131. (Shushlyapin O. I., Kononenko L. G., Mannik I. M. 2006. Von Willebrand factor and its role in endothelial dysfunction in ischemic heart disease: diagnostics, criteria of prognosis and perspective treatment approaches. Ukr. J. of Cardiol. 3 : 126—131.)

Bresgen N., Karlhuber G., Krizbai I., Bauer H., Bauer H. C., Eck P. M. 2003. Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. J. Neurosci. Res. 72 : 327—333.

Fong G. H. 2008. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. J. Angiogenesis. 11 : 121—140.

Forsythe J. A., Jiang B. H., Iyer N. V., Agani F., Leung S. W., Koos R. D., Semenza G. L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol. Cell. Biol. 16 : 4604—4613.

Hickey M. M., Simon M. C. 2006. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. Curr. Top. Develop. Biol. 76 : 217—257.

Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker G. C., Ninick C. R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J. Clin. Invest. 52 : 2745—2756.

Natarajan R., Fisher B. J., Fowler A. A. 2003. Regulation of hypoxia inducible factor-1 by nitric oxide in contrast to hypoxia in microvascular endothelium. FEBS Lett. 549 : 99—104.

Rassaf T., Feelisch M., Kelm M. 2004. Circulating NO pool assessment of nitrite and nitrosospecies I blood and tissues. Free. Rad. Biol. Med. 36 : 413—422.

Ziegelstein R. C., He C., Hu Q. 2003. Hypoxia/reoxygenation stimulates Ca<sup>2+</sup>-dependent ICAM-1 mRNA expression in human aortic endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322 : 68—73.

Поступила 1 VIII 2013

PROLIFERATIVE AND SECRETORY ACTIVITY OF HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS CULTURED UNDER VARYING DEGREES OF HYPOXIA

L. V. Antonova,<sup>1</sup> V. G. Matveeva, M. N. Chernova, E. A. Velikanova, A. V. Ponasenko, A. S. Golovkin

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo; <sup>1</sup>e-mail: antonova.la@mail.ru

In this study we examined the impact of 3-day hypoxia of varying degrees on the viability, proliferative and secretory activity of endothelial cells in human umbilical vein (HUVEC). The gas mixture of the three components (%) was used: 1) 10 O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>, 85 Ar; 2) 5 O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>, 90 Ar and 3) 1 O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>, 94 Ar. The HUVEC, cultivated in CO<sub>2</sub>-incubator under conditions of atmospheric oxygen (21 % O<sub>2</sub>) were the controls. Comprehensive assessment of the results after has shown that 3-day HUVEC cultivating in the presence of 1 % O<sub>2</sub> led to pathological activation of endotheliocytes: increased NO synthesis combined with the marked secretion of endothelin-1, IL-6, IL-8 and TNF-alpha, sVCAM-1, sE-cadherin and of sE-selectin, VEGF-A and bFGF, and slow proliferation. When HUVEC were cultivated at 10 % O<sub>2</sub> and 5 % O<sub>2</sub>, the level of basal secretion of the

substances listed above was the least against the background of increased proliferative activity. The results showing the changes in the secretory activity of endothelial cells when cultivated under the conditions of atmospheric oxygen levels have demonstrate HUVEC activation, because the secretion of NO, IL-6, IL-8 and von Willebrand factor after 3 days of cultivation in 21 % O<sub>2</sub> exceeded that in the case of 10 and 5 % O<sub>2</sub>. Thus, a gaseous medium with reduced oxygen content of up to 5 % provides more physiological conditions for HUVEC cultivation. The maximum proliferative activity of HUVEC with minimal basal secretion proved such a composition to be comfortable. Increasing the oxygen content to the atmospheric level leads to the activation of endotheliocytes with signs of endothelial dysfunction, and the critical reduction in oxygen to 1 % causes the development of endothelial dysfunction and reduces the proliferative potential.

**Key words:** hypoxia, endothelial cells, proliferation, dysfunction, cytokines.

---