

## ДЕЙСТВИЕ БИОГЕННЫХ И АБИОГЕННЫХ ДИСУЛЬФИДОВ НА КЛЕТКИ ЭНДОТЕЛИЯ В КУЛЬТУРЕ: СРАВНЕНИЕ ТРЕХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

© Д. С. Прокофьева,<sup>1,\*</sup> Н. В. Гончаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии  
и экологии человека Федерального медико-биологического агентства и

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: [darija-p1@yandex.ru](mailto:darija-p1@yandex.ru)

Влияние биогенных и абиогенных дисульфидов на жизнеспособность клеток эндотелия пупочной вены человека в культуре исследовали, применяя три метода — включение в клетки нейтрального красного (НК), определение количества АТФ в клетках и варианты метода Мосмана, суть которых состоит в восстановлении клетками солей тетразолия — МТТ и МТС (Mosmann, 1983). В качестве абиогенного дисульфида был выбран 2,2'-дитио-бис(N,N-диэтил)этанамин (ДС), а в качестве биогенных дисульфидов использовали окисленный глутатион (GSSG) и масло чеснока (МЧ), мажорным компонентом которого является диаллилдисульфид (ДАДС). Установлено, что ДС и МЧ обладают сопоставимым цитотоксическим действием (EC<sub>50</sub> составляет ~0.6 мМ), в то время как GSSG в концентрациях вплоть до 1 мМ не влияет на жизнеспособность клеток эндотелия. Впервые показана медиаторная активность ДС и МЧ по отношению к оксидоредуктазам плазматической мембраны клеток эндотелия при использовании в качестве субстрата солей тетразолия, обуславливающая ложноотрицательный эффект. В связи с этим метод Мосмана имеет серьезные ограничения при оценке влияния дисульфидов на жизнеспособность клеток, но может быть использован при исследовании механизма их действия.

Ключевые слова: дисульфиды, глутатион, масло чеснока, эндотелий, цитотоксичность.

Принятые сокращения: ДС — 2,2'-дитио-бис(N,N-диэтил)этанамин, ДАДС — диаллилдисульфид, МЧ — масло чеснока, НК — нейтральный красный, ФБ — фосфатно-солевой буферный раствор, PMS — 5-метилфеназинметилсульфат.

Тиолы и дисульфиды широко распространены в природе (Jocelyn, 1972; Munday, 1989, 2012). Их роль в функционировании клеток и организмов чрезвычайно велика. Многие экзогенные тиолы и дисульфиды биогенного происхождения являются важнейшими компонентами продуктов питания и лекарственных растений, например аллицин чеснока или бис(2-фурфурил)дисульфид обжаренных кофейных зерен. В то же время существует немало токсичных дисульфидов биогенного и особенно абиогенного происхождения (Munday, 1989, 2012), которые могут вызывать заболевания животных и человека (Hutchison, 1977; Munday, 1982; Stevens, 1984). Абиогенные тиолы и дисульфиды образуются при термической обработке продуктов питания (Schutte, 1974; Garbusov et al., 1976; MacLeod, Seyyedain-Ardebili, 1981) и используются в промышленности в качестве компонентов смазочных материалов, катализаторов и одорантов горючих газов (Hiley et al., 1981; Nomura et al., 1982; Rygle et al., 1984). Кроме того, они образуются как побочные продукты в производстве бумаги, при очистке нефти и природного газа (Vol'tsov, Lyapina, 1980; Zygmunt et al., 1983; Kangas et al., 1984). Различные тиолы используют для получения пестицидов фосфорорганической природы, а ранее их использовали для получения фосфорорганических отравля-

ющих веществ; как правило, эти же тиолы и соответствующие дисульфиды образуются при разрушении или спонтанном гидролизе этих соединений (Murai, 1977; Lee et al., 1978; Munro et al., 1999).

Фосфорорганические отравляющие вещества V-типа, в особенности RVX, — это наиболее токсичные вещества нервно-паралитического действия. Согласно Конвенции по химическому разоружению 1993 г. (Анон, 2005) в РФ ведется непрерывная работа по обезвреживанию RVX на объектах уничтожения химического оружия, суть которой заключается в использовании специальных дегазирующих растворов, которые повышают скорость гидролиза RVX в направлении образования нетоксичной изобутилметилфосфоновой кислоты и N,N-диэтиламиноэтантиола. В абиотической среде почти весь тиол довольно быстро окисляется до дисульфида 2,2'-дитио-бис(N,N-диэтил)этанамин (ДС) (Савельева и др., 2002). Вероятность контакта персонала объектов с данным соединением достаточно высока, а последствия контакта неизвестны, так как токсичность данного соединения до сих пор не охарактеризована. Проведенные нами исследования действия ДС *in vivo* на белых беспородных мышах позволили установить параметры его токсичности (ЛД<sub>50</sub> составила 560 мг на 1 кг массы животного при внутрижелудочном

введении) и предположить, что основной мишенью ДС могут быть клетки эндотелия кровеносных сосудов (Войтенко и др., 2013). Для проверки этого предположения необходимо было исследовать влияние ДС на жизнеспособность клеток эндотелия в культуре. В качестве веществ сравнения использовали дисульфиды биогенного происхождения — окисленный глутатион (GSSG) и масло чеснока (МЧ), которое представляет собой смесь различных моно-, ди- и полисulfидов (Lawson et al., 1991; O’Gara et al., 2000).

Для изучения действия дисульфидов на клетки эндотелия мы выбрали три широко используемых метода оценки жизнеспособности клеток, которые можно применять при работе с адгезионными культурами в планшетном формате: включение нейтрального красного (Bogenfreund, Puerner, 1984), определение АТФ в клетках с помощью биолуминесценции (Kangas et al., 1984; Crouch et al., 1993) и метод Мосмана с модификациями (Mosmann, 1983; Denizot, Lang, 1986; Cory et al., 1991). Суть метода Мосмана состоит в восстановлении клетками солей тетразолия — МТТ и МТС. Все три метода имеют хорошую корреляцию с традиционным методом оценки жизнеспособности клеток — исключение трипанового синего (Kuzmits et al., 1986; Ishikawa et al., 1993; Basha et al., 1996; Lindl et al., 2005), не уступая ему в чувствительности (Kuzmits et al., 1986; Lindl et al., 2005). Кроме того, преимуществами этих методов являются меньшая трудоемкость, большая производительность и отсутствие необходимости перевода адгезионной культуры в суспензию.

Цель настоящей работы — оценка влияния дисульфидов различной природы на жизнеспособность клеток эндотелия пупочной вены человека в культуре.

### Материал и методика

Клетки и световая микроскопия. Эндотелиальные клетки выделяли из пупочной вены человека и культивировали по описанной методике (Gimbrone et al., 1978) с модификациями (Danilov et al., 1984; Гончаров и др., 1987). В работе использовали клетки 2—3-го пассажа, находящиеся в плотном монослое в 96-луночных планшетах. Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста, используя объектив с увеличением 10×; клетки фотографировали с помощью цифровой видеокамеры Penguin 150CL (Pixera, США; адаптер 1×, матрица 1/2" CCD, 1.5 млн пикселей) и программного обеспечения Видеотест-Размер 5.0. Клетки культивировали в присутствии исследуемых веществ в течение 10 мин, 3, 6 и 24 ч.

Дисульфиды и растворы для тестирования. ДС был синтезирован и любезно предоставлен А. Ф. Хлебниковым (СПбГУ). Чистота препарата по данным газохроматографического анализа, составляла 99.1 %. Маточный раствор ДС (1 мМ) готовили на ацетонитриле (о. с. ч., Криохром, Россия) и хранили при 4 °С. Рабочие растворы ДС готовили на фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (Биолот, Россия) и вносили их в лунки с клетками по 10 мкл на лунку.

Концентрация маточного раствора МЧ (смесь 30—50 % диаллилдисульфида (ДАДС), 10—13 % диаллилтрисульфида, 5—13 % аллилсульфида и ряда других минорных соединений; Aldrich, США) составляла 200 мг/мл.

### Состав экспериментальных, контрольных и холостых проб

Проба	Клетки	Дисульфиды	PBS или ацетонитрил
Экспериментальная	+	+	–
Контрольные	+	–	+
Холостые	–	–	+
Дополнительные холостые	–	+	–

Концентрацию МЧ в культуральной среде представляли в пересчете на ДАДС (мМ), содержание которого в МЧ принимали равным 50 %. Рабочие растворы готовили аналогично ДС на ацетонитриле и вносили в лунки по 1 мкл. Маточный раствор GSSG (1 мМ, Sigma, США) и рабочие растворы готовили на PBS. Все рабочие растворы готовили непосредственно перед использованием.

Контрольные и холостые пробы. Контролем служили клетки в культуральной среде в лунках, в которые вносили по 10 мкл PBS или по 1 мкл ацетонитрила. Результаты всех используемых методов оценки жизнеспособности клеток показали, что небольшие количества ацетонитрила, присутствующие в рабочих растворах ДС, не оказывают цитотоксического действия на клетки эндотелия. В качестве холостой пробы использовали чистую среду культивирования (без клеток), куда также вносили соответствующий объем PBS или ацетонитрила. Чтобы убедиться в том, что исследуемые соединения не взаимодействуют с реактивами используемых методов, готовили дополнительные холостые пробы, представляющие собой среду для культивирования с внесенными в нее рабочими растворами дисульфидов (см. таблицу).

Методы. Для оценки накопления красителя НК (Tox-4 kit, Sigma, США) в клетках эндотелия готовили рабочий раствор из коммерчески доступного 0.33%-ного раствора красителя путем разбавления его в 50 раз культуральной средой 199 (с солями Эрла, Sigma, США), содержащей 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США). Раствор готовили за 3 ч до эксперимента и выдерживали его при 37 °С. Перед применением раствор центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g для удаления образовавшихся кристаллов. По окончании культивирования клеток в присутствии растворов исследуемых веществ клетки промывали раствором Хэнкса (Биолот, Россия), затем вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора НК, выдерживали планшеты в термостате в течение 2.5 ч, снова промывали клетки раствором Хэнкса и в каждую лунку вносили по 150 мкл 1 %-ного раствора уксусной кислоты в 50%-ном водном растворе этилового спирта для высвобождения красителя из клеток. Содержимое лунок планшета сначала перемешивали в течение 10 мин при 600 об/мин на шейкере (Shaker ST-3L, ELMi, Латвия) при комнатной температуре, а затем вручную с помощью многоканальной пипетки. Абсорбцию проб считывали на планшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron Co., США) при длине волны 540 нм против холостой пробы.

Для анализа цитотоксичности с помощью метода Мосмана и его модификаций (Mosmann, 1983; Denizot, Lang, 1986; Cory et al., 1991) по восстановлению клетками солей тетразолия МТТ и МТС (Sigma и Promega, США соответственно) в лунки планшетов с клетками по окончании культивирования с исследуемыми веществами вно-

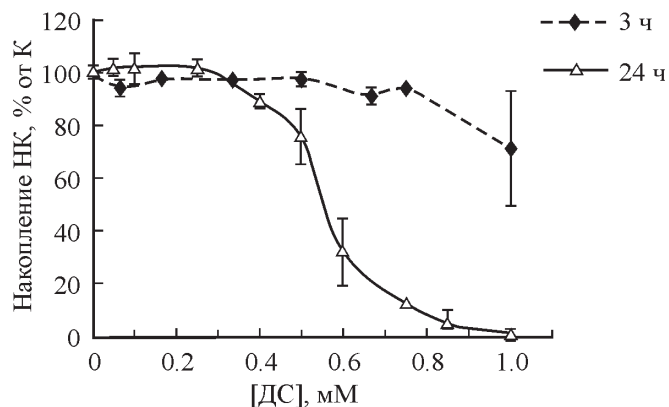


Рис. 1. Влияние абиогенного дисульфида ДС на накопление клетками эндотелия нейтрального красного (НК).

Здесь и на рис. 2—4: К — контроль.

силы по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) или смесь растворов МТS (2 мг/мл) и PMS (0.92 мг/мл) в объемном соотношении 20 : 1. Смесь готовили непосредственно перед использованием. Растворы готовили на PBS, стерилизовали фильтрованием и хранили в аликвотах при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Аликвоты размораживали в день эксперимента и берегли от светового воздействия. Считывание абсорбции содержимого лунок проводили спустя 1 ч после добавления в лунки растворов производных формазана (МТТ или МТS). При использовании МТТ перед считыванием абсорбции проб в лунки планшета вносили по 100 мкл ДМСО (Panreac, Испания) для растворения формазановых кристаллов. Абсорбцию при использовании МТS считывали при длине волны 492 нм, а при использовании МТТ — при 540 нм планшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron Co., США).

Для того чтобы оценить активность оксидоредуктаз плазматической мембраны при использовании МТТ, по окончании культивирования клеток с ДС в части экспериментов, посвященных исследованию внутриклеточной и внеклеточной активности оксидоредуктаз, отбирали среду из лунок планшета и переносили ее в пустой планшет для проведения измерения абсорбции проб при 540 нм. Оставшиеся в планшете клетки однократно промывали PBS, экстрагировали из них формазановый продукт внесением в лунки 150 мкл ДМСО и регистрировали абсорбцию содержимого лунок при 540 нм для оценки внутриклеточной активности оксидоредуктаз. В отдельных экспериментах, связанных с исследованием медиа-

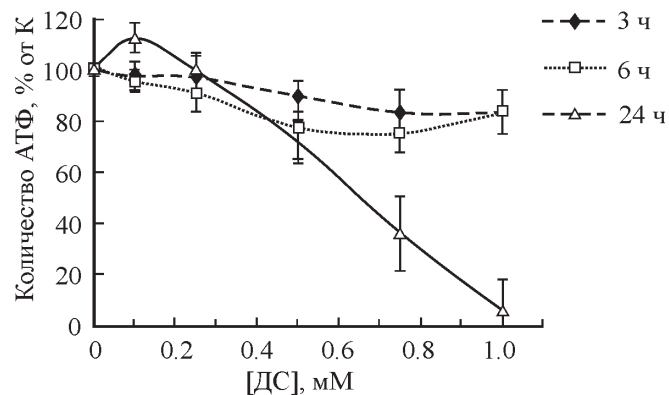


Рис. 2. Влияние ДС на содержание АТФ в клетках эндотелия.

торной активности дисульфидов, мы использовали МТS в отсутствие PMS, заменяя его эквивалентным объемом PBS.

Для оценки содержимого АТФ в клетках после воздействия исследуемых веществ их однократно промывали PBS и лизировали с помощью раствора, входящего в набор соответствующих реагентов (ATP Bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, США). Люминесценцию полученных лизатов регистрировали в соответствии с инструкцией производителя на приборе Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, США) против холостой пробы.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0. Перед анализом данных проводили проверку нормальности их распределения (тест Колмогорова—Смирнова). Поскольку данные подчинялись нормальному распределению, для дальнейшей обработки использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ. Для сравнения экспериментальных данных с контрольными значениями использовали тест Dunnett, для выявления статистически значимых различий между двумя концентрациями исследуемых веществ при фиксированном времени культивирования клеток с исследуемыми веществами использовали тест Бонферрони. Критический уровень значимости ( $P$ ) при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05. Для расчета  $EC_{50}$  (полумаксимальная эффективная концентрация дисульфидов в отношении показателя, измеряемого тем или иным методом оценки жизнеспособности клеток) применяли нелинейный регрессионный анализ. Для оценки характера и степени влияния двух факторов (концентрации и времени культивирования клеток с дисульфидами) на результаты метода Мосмана применяли двухфакторный дисперсионный анализ. Данные на рисунках представлены в виде средних величин и их стандартных отклонений, полученных по результатам как минимум трех отдельных экспериментов. Каждую пробу в эксперименте готовили в тройном повторе.

## Результаты

С помощью метода накопления НК мы обнаружили, что ДС начинает оказывать статистически значимое токсическое действие на клетки эндотелия, когда его конечная концентрация в среде превышает 0.5—0.75 мМ, в зависимости от времени воздействия ДС на клетки (рис. 1). Увеличение времени культивирования клеток в присутствии ДС с 3 до 24 ч приводит к некоторому росту наблюдаемых эффектов для высоких концентраций ДС. Согласно методу включенного НК,  $EC_{50}$  при 24-часовом воздействии ДС составляет  $0.56 \pm 0.01$  мМ. Статистически значимые отличия опытных проб от контрольных при определении количества АТФ в клетках при действии ДС начинаются с концентрации 0.5 мМ для всех сроков воздействия (рис. 2). Снижение содержания АТФ в 2 раза по сравнению с контрольным значением ( $EC_{50}$ ) при воздействии ДС в течение 1 сут составляет  $0.65 \pm 0.02$  мМ. Данные, полученные для трех временных интервалов, свидетельствуют об отсутствии выраженной зависимости между временем контакта клеток с ДС и его влиянием на их жизнеспособность, за исключением концентраций 0.75 и 1 мМ, при которых наблюдается гибель клеток при длительном воздействии. Мы не выявили существенных раз-



личий между характером изменения кривых, полученных двумя методами для одних и тех же интервалов времени культивирования клеток с ДС.

При культивировании клеток эндотелия с 1 мМ ДС в течение 3 ч уровень АТФ в клетках не отличается от уровня при концентрации ДС 0.75 мМ (рис. 2). Однако спустя еще 3 ч количество АТФ при воздействии 1 мМ ДС выше, чем в случае 0.75 мМ ДС (рис. 2, кривая 6 ч;  $P < 0.05$ ). Через 24 ч после начала воздействия 1 мМ раствора концентрация АТФ в клетках эндотелия снижается до нуля и они погибают. Можно предположить, что ДС не действует или слабо действует на энергопродуцирующие механизмы (гликолиз, цикл Кребса и дыхательная цепь), а гибели клеток предшествует фаза временного повышения уровня АТФ за счет снижения АТФазной активности ионных насосов и потребления АТФ в многочисленных реакциях фосфорилирования.

Данные по влиянию МЧ на клетки эндотелия представлены на рис. 3. МЧ начинает оказывать цитотоксическое действие в том же диапазоне концентраций, что и ДС. Статистически значимые отличия опытных проб от контрольных по количеству АТФ в клетках при культивировании в присутствии МЧ начинаются с концентрации МЧ 0.53 мМ при 3- и 6-часовом воздействии и с 0.35 мМ при 24-часовом. Однако даже после 24-часового культивирования клеток с самым концентрированным раствором МЧ мы не наблюдали 100%-ного снижения уровня АТФ. Представленные на рис. 3 кривые выходят на плато при больших концентрациях, что помешало нам рассчитать  $EC_{50}$ . Эти отличия от действия ДС могут свидетельствовать об ограниченной растворимости компонентов МЧ в среде и (или) о различных путях детоксикации биогенных и абиогенных ди- и полисульфидов. МЧ в концентрациях, соответствующих 0.35 и 0.71 мМ ДАДС, через 24 ч обуславливает парадоксальные, но статистически значимые ( $P < 0.05$ ) различия уровней АТФ в клетках: уровень АТФ существенно ниже при низкой концентрации МЧ, чем при более высоких. Аналогичную, но менее выраженную картину мы наблюдали при накоплении НК (не показано). Очевидно, при действии больших концентраций МЧ фаза резкого снижения АТФ наступает раньше, в диапазоне между 6 и 24 ч.

Что касается еще одного биогенного дисульфида, GSSG, мы не обнаружили его влияния на жизнеспособность клеток эндотелия в течение 24-часового воздействия вплоть до концентрации 1 мМ (данные не представлены), которая на 4 порядка превышает физиологическую концентрацию GSSG в плазме крови (Jones et al., 2000).

Таким образом, мы не выявили существенных различий между характером кривых, полученных с помощью двух тестов (по накоплению НК и уровню АТФ) для разных сроков действия исследуемых дисульфидов на клетки. В то же время применение еще одного метода оценки жизнеспособности клеток неожиданно дало ложноотрицательный результат. Оказалось, что ДС и МЧ дозозависимо повышают способность клеток эндотелия восстанавливать соль тетразолия, используемую в модифицированном методе Мосмана (Coqu et al., 1991) (рис. 4).

На первом этапе работы использовали соль тетразолия MTS, которая в отличие от традиционно используемой MTT после восстановления оксидоредуктазами в присутствии медиатора электронов (PMS) образует водорастворимый продукт, что позволяет снизить трудозатраты и погрешность получаемых результатов. Оказа-

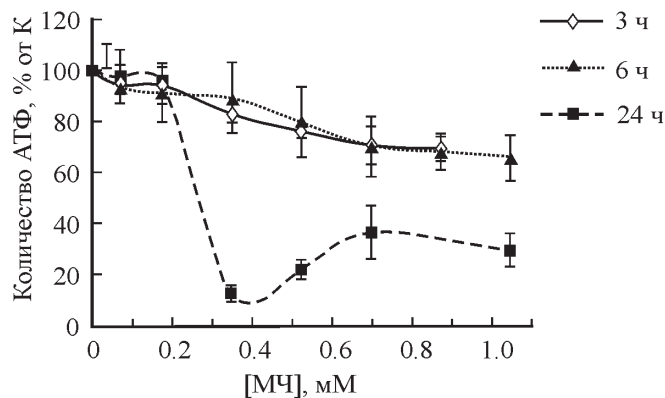


Рис. 3. Влияние биогенного дисульфида МЧ на содержание АТФ в клетках эндотелия.

Концентрацию МЧ в культуральной среде пересчитывали на ДАДС (один из компонентов МЧ), содержание которого в МЧ принимали равным 50 %.

лось, что ДС начиная с 0.25 мМ статистически значимо повышает способность клеток восстанавливать MTS в присутствии PMS, что справедливо для всех сроков культивирования клеток с веществом (рис. 4). Отличия от кажущегося «повышения жизнеспособности» клеток наблюдаются лишь через 24 ч взаимодействия клеток с ДС в концентрациях 0.75 и 1 мМ. В то же время не только данные двух других тестов, но и морфология эндотелиальных клеток свидетельствуют о негативном влиянии ДС уже через 3 ч воздействия на клетки начиная с концентрации 0.5 мМ (рис. 5). Следовательно, снижение восстановительной активности клеток эндотелия по отношению к MTS при высоких концентрациях ДС спустя 24 ч обусловлено их гибелью. При сравнении результатов, полученных при 3- и 6-часовом действии ДС на клетки, было показано, что не только концентрация, но и время действия вещества статистически значимо влияет на восстановительную активность клеток эндотелия ( $P < 0.001$ ). Пост-тест Бонферрони выявил значимые различия только для двух из пяти используемых концентраций ( $P < 0.01$ ). Статистически значимое повышение активности клеток в присутствии МЧ, проявляющееся в их способности восстанавливать MTS, начинается с концентрации 0.175 мМ спустя 3 ч после добавления МЧ. Через 1 сут после начала воздействия, как и в случае с ДС, наблюдается сниже-

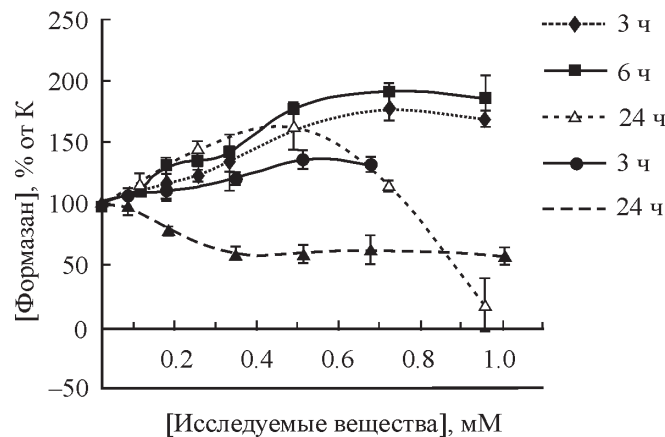


Рис. 4. Повышение количества образующегося формазанового продукта (MTS в присутствии PMS) при действии на клетки эндотелия ДС и МЧ.

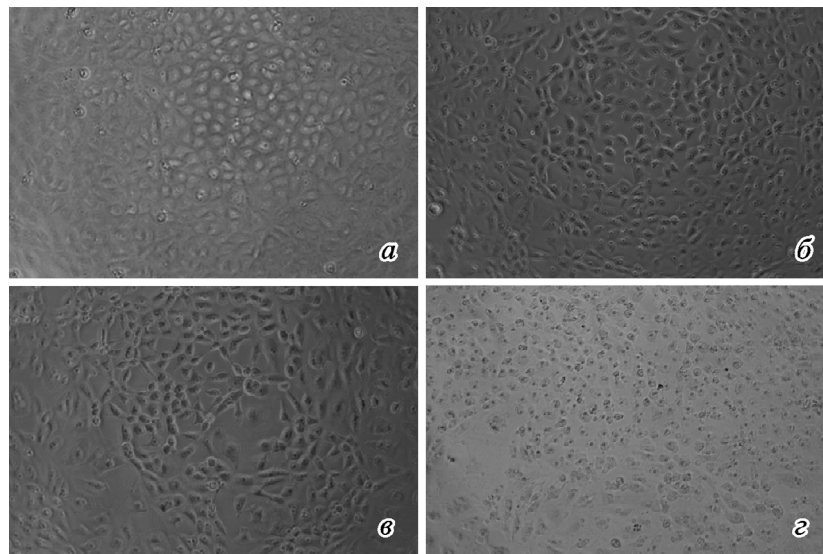


Рис. 5. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека в культуре: контрольные (а) и через 3 воздействия ДС в концентрациях 0.5 (б), 0.75 (в) и 1 (г) mM.

ние восстанавливающей активности клеток. Однако снижение активности в случае МЧ статистически значимо начинает проявляться с более низкой концентрации — 0.175 mM. Отметим, что при 3-часовом воздействии ДС оказывает более сильное влияние на восстанавливающую активность клеток эндотелия, чем МЧ.

Для выяснения причин повышения количества образующегося формазанового продукта при использовании MTS мы заменили раствор PMS на PBS при действии на клетки эндотелия исследуемых веществ. В результате абсорбция контрольной пробы уменьшилась примерно в

20 раз, но повышающее абсорбцию действие дисульфидов сохранилось. На рис. 6, а представлены данные, полученные для ДС. Более того, сохранился характер зависимости абсорбции от концентрации дисульфидов, который подтверждается совпадением кривых, полученных в экспериментах без PMS (рис. 6, а, кривая 2), и кривых, полученных в результате вычитания значения абсорбции контрольной пробы из экспериментальных значений с использованием PMS (рис. 6, а, кривая 3). Аналогичные результаты были получены для 6-часового культивирования (не показано). Эти данные позволяют предположить, что ДС и МЧ, как и PMS, являются медиаторами электронов.

Для того чтобы сравнить медиаторные активности исследуемых веществ и PMS, уменьшив при этом зависимость системы от возможной экспрессии индуцибельных белков, мы снизили время культивирования клеток с веществами до 10 мин, после чего в лунки с клетками вносили раствор MTS. Результаты сравнения ДС, МЧ и PMS по их способности выступать в качестве медиаторов электронов приведены на рис. 7. Восстановительная активность PMS более чем на порядок превышает восстановительную активность ДС. МЧ оказывает менее выраженный эффект на клетки эндотелия по сравнению с ДС, хотя статистически значимые отличия от контроля начинаются примерно с одних и тех же значений концентрации — 0.25 mM для ДС и 0.35 mM для МЧ.

Чтобы выяснить, как влияет время культивирования клеток с веществами на их восстановительную активность по отношению к MTS при краткосрочном воздействии, была проведена серия экспериментов, в которых на одном планшете культивировали клетки с веществом в

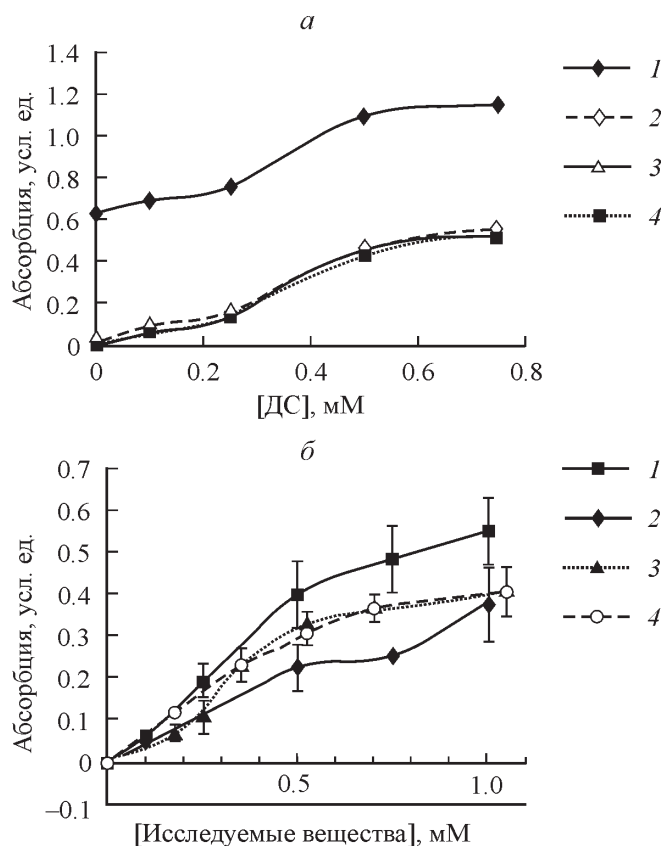


Рис. 6. Влияние ДС и МЧ на восстановление клетками соли тетразолия MTS.

а — ДС, 3 ч культивирования; кривые: 1, 2 — в присутствии и в отсутствие PMS соответственно; 3 — разница между значениями абсорбции кривой 1 и контрольной пробы; 4 — разница между значениями абсорбции кривой 2 и контрольной пробы. б — ДС и МЧ (показана разница значений абсорбции между опытными пробами и контрольной); кривые: 1, 2 — действие ДС в течение 10 мин и 3 ч соответственно; 3, 4 — МЧ в течение 10 мин и 3 ч соответственно.

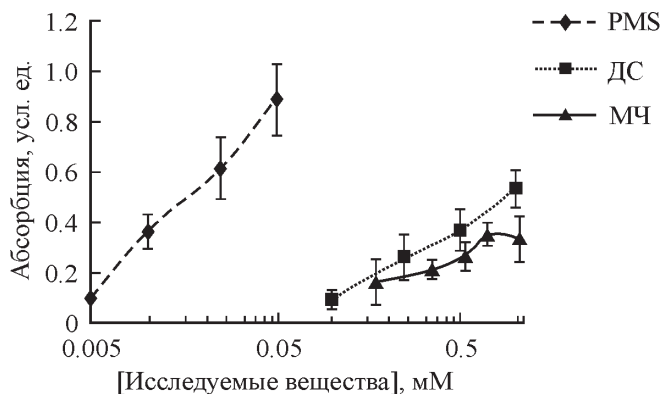


Рис. 7. Восстановление MTS эндотелиальными клетками в присутствии ДС, МЧ и донора электронов PMS в течение 10 мин.

Показана разница значений абсорбции между опытными пробами и контрольной.

течение 10 мин и 3 ч. Результаты представлены на рис. 6, б. Видно, что восстановительная активность клеток эндотелия по отношению к MTS не меняется в зависимости от времени культивирования их с МЧ в указанном интервале (рис. 6, б, кривые 3 и 4). Однако для ДС не только концентрация, но и время культивирования статистически значимо влияет на восстановительную активность клеток (рис. 6, б, кривые 1 и 2,  $P < 0.001$ ). Кроме того, пост-тест Бонферрони выявил статистически значимые различия для всех используемых концентраций, за исключением 0.1 мМ, при сравнении двух интервалов времени ( $P < 0.01$ ). Данные, приведенные на рис. 6, б, могут свидетельствовать о том, что для установления стационарного состояния в системе, содержащей клетки эндотелия и ДС, требуется более 10 мин, тогда как в присутствии МЧ этого времени вполне достаточно. Нельзя также исключать, что ДС является не только медиатором электронов, но и индуктором активности оксидоредуктаз плазматической мембраны.

На следующем этапе работ мы использовали МТТ, поскольку эта соль тетразолия легко проникает внутрь клеток и позволяет получить информацию об активности внутриклеточных оксидоредуктаз. Кроме того, часть

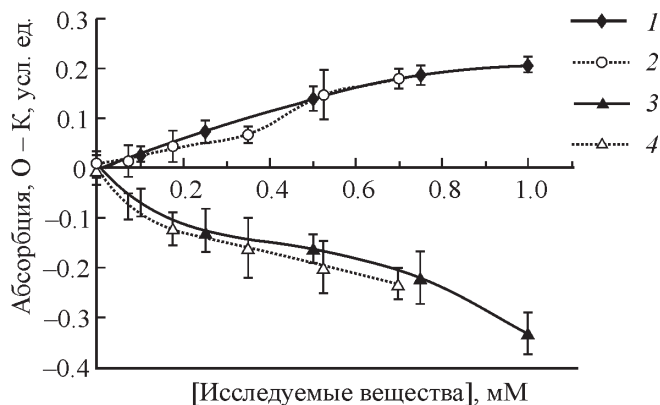


Рис. 8. Образование формазанового продукта МТТ клетками эндотелия в присутствии ДС (1, 3) и МЧ (2, 4) в течение 3 ч культивирования.

Кривые: 1, 2 — во внеклеточной среде после действия ДС и МЧ соответственно; 3, 4 — то же во внутриклеточной среде. Показана разница O—K.

МТТ может восстанавливаться вблизи поверхности клеток (Burdon et al., 1993). Данные на рис. 8 представлены в виде разницы между абсорбцией опытных и контрольных проб. Мы подтвердили медиаторное (или) индуцирующее действие ДС и МЧ по отношению к оксидоредуктазам плазматической мембраны (рис. 8, кривые 1 и 2). Восстановительная активность внеклеточных оксидоредуктаз по отношению к МТТ и МТС в отсутствие PMS оказалась идентичной (не показано). В то же время действие ДС и МЧ на клетки эндотелия приводит к дозозависимому снижению активности внутриклеточных оксидоредуктаз начиная с концентрации 0.1 мМ (рис. 8, кривые 3 и 4). Это та же минимальная концентрация исследуемых веществ, при которой наблюдаются их медиаторные эффекты по отношению к внеклеточным оксидоредуктазам. Однако GSSG не оказывает влияния на восстановительную активность клеток по отношению к МТС и МТТ вплоть до концентрации 1 мМ при 24-часовом действии.

### Обсуждение

Метод Мосмана, основанный на восстановлении клетками одной из солей тетразолия (МТТ), был разработан давно (Mosmann, 1983) и быстро нашел широкое применение при оценке жизнеспособности различных клеточных культур. Однако до сих пор остается невыясненным до конца, какие биохимические процессы вовлечены в восстановление солей тетразолия, а также внутриклеточная локализация процессов. Отчасти поэтому при использовании метода Мосмана возникают ошибки (Natarajan et al., 2000; Bruggisser et al., 2002; Maioli et al., 2009; Wang et al., 2011). Ранее полагали, что восстановление солей тетразолия происходит только внутри клеток и зависит исключительно от функционального состояния митохондрий. С течением времени это было опровергнуто. Для некоторых клеточных культур показано, что основной вклад в восстановление солей тетразолия вносят цитозольные дегидрогеназы. В качестве примера можно привести линию 32D, полученную из костного мозга (Berridge, Tan, 1993), клеточную культуру гепатоцитов человека HepG2 (Bernas, Dobrucki, 2002), астроглию (Takahashi et al., 2002) и клеточную линию В12 (Liu et al., 1997). Кроме того, показано, что восстановление МТТ — соли тетразолия, используемой в оригинальном варианте метода Мосмана, — осуществляется мембранами лизосом и эндосом внутри клеток и плазматической мембраной вне клеток (Liu et al., 1997). В начале 1990-х годов на смену МТТ пришли тетразолиевые красители (например, МТС), образующие водорастворимые цветные продукты и требующие для своей работы присутствия медиаторов электронов, таких как PMS. Эта группа солей тетразолия в отличие от МТТ характеризуется общим отрицательным зарядом своих молекул и неспособностью проникать внутрь клеток (Cory et al., 1991; Marshall et al., 1995). Полагают, что восстановление этих красителей осуществляется на поверхности клеток посредством трансмембранного переноса электронов с участием медиаторов (Berridge et al., 1996; Ly, Lawen, 2003). Без понимания механизмов восстановления трудно объяснить возникающие в некоторых экспериментах расхождения в результатах метода Мосмана и других методов оценки жизнеспособности клеток. В частности, при оценке влияния дисульфидов на жизнеспособность клеток эндотелия оказалось, что использование метода Мосмана для этой цели



непригодно. Однако с помощью различных модификаций данного метода мы смогли установить, что ДС и МЧ обладают медиаторным действием по отношению по крайней мере к двум солям тетразолия — МТТ и МТС. Кроме того, есть основания полагать, что ДС в отличие от МЧ способен индуцировать экспрессию белков, участвующих в восстановлении солей тетразолия. Об этом свидетельствуют данные, представленные на рис. 4 и 6, б. Мы установили, что восстановление солей тетразолия после культивирования клеток с МЧ не зависит от времени культивирования, в то время как для ДС были показаны статистически значимые различия результатов, полученных спустя 10 мин, 3 и 6 ч культивирования клеток в присутствии ДС.

Довольно простой и в то же время эффективный способ раскрытия механизмов восстановления формазановых красителей — применение «двухстороннего» варианта метода Мосмана, который позволяет оценить внутриклеточное и внеклеточное восстановление солей тетразолия в одной и той же пробе. Этот подход мы применили впервые для изучения действия исследуемых веществ на клетки. Мы нашли лишь одну публикацию с описанием такого двухстороннего варианта метода Мосмана, в которой проводили оценку не только внутриклеточного, но и внеклеточного восстановления МТТ (Burdon et al., 1993). Однако это было сделано только для получения дополнительных сведений о восстановлении МТТ различными клеточными компартментами (органеллами). Мы показали, что при использовании такого двухстороннего варианта метода количество восстановленного формазанового продукта внутри клеток эндотелия пупочной вены человека составляет  $84 \pm 3\%$  от его общего числа, в то время как вне клеток —  $16 \pm 2\%$ . Примерно такое же соотношение было получено для клеток линии HeLa (Burdon et al., 1993).

Известно, что некоторые вещества способны реагировать с солями тетразолия с образованием окрашенных продуктов в отсутствие живых организмов, обуславливая ложноположительные или ложноотрицательные результаты метода Мосмана (Peng et al., 2005; Luru, Popescu, 2013). К ним относятся многие редокс-соединения: аскорбиновая кислота (Chakrabarti et al., 2000), альбумин, цистеин, восстановленный глутатион (Huang et al., 2004; Funk et al., 2007), дитиотреитол,  $\beta$ -меркаптоэтанол, N-ацетил-L-цистеин, пирролидиндитиокарбамат (Natarajan et al., 2000), витамин E, фитоэстрогены (кемпферол и резвератрол) (Bruggisser et al., 2002) и полифенолы зеленого чая (Wang et al., 2010). Кроме того, известны вещества, которые прямо не взаимодействуют с солями тетразолия, но способны повышать или понижать количество формазановых продуктов, образуемых в результате жизнедеятельности клетки, например: ротлерин (Maioli et al., 2009), повышающий количество формазанового продукта предположительно из-за разобщения окислительного фосфорилирования в эндотелиальных клетках микрососудов человека; холестерин, обладающий противоположным действием за счет своей способности повышать скорость экзоцитоза формазановых гранул, что было показано на эндотелиальных клетках микрососудов легких и коронарных артерий человека (Ahmad et al., 2006). Использование дополнительных холостых проб при проведении анализа позволило нам заключить, что МЧ и ДС относятся ко второй категории веществ, так как значения абсорбций дополнительных холостых проб лишь незначительно отличались от значения абсорбции

холостой пробы, что учитывали при проведении расчетов.

Немало публикаций свидетельствует о недостатках (ограничениях) метода Мосмана, но лишь часть из них посвящена исследованию процессов, лежащих в основе метода, и способам преодоления ограничений (Burdon et al., 1993; Liu et al., 1997; Collier, Pritsos, 2003; Vellonen et al., 2004). В наших экспериментах сделаны только первые шаги по выявлению возможностей метода, который может оказаться простым и эффективным инструментом, позволяющим раскрыть механизм токсического и (или) фармакологического действия тиолов, дисульфидов и других редокс-соединений.

Использование нескольких методов оценки жизнеспособности клеток позволило нам охарактеризовать воздействие исследуемых веществ на культуру эндотелия. С помощью НК и определения количества АТФ мы установили, что величина  $EC_{50}$ , полученная расчетным методом для ДС, лежит в диапазоне от 0.56 до 0.65 мМ. Действие МЧ оказалось сопоставимо с действием ДС, а GSSG не оказывает влияния на жизнеспособность клеток вплоть до 1 мМ. Необходимо отметить, что выбранный для проведения исследования диапазон концентраций ДС является токсикологически релевантным, поскольку расчетная концентрация ДС в крови мышей при остром отравлении ДС в дозе ЛД<sub>50</sub> лежит в диапазоне 0.2—0.6 мМ. Таким образом, гипотеза о существенной роли эндотелия в токсикологии ДС получила еще одно подтверждение.

#### Список литературы

- Анон. 2005. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и об его уничтожении, русская версия. Технический секретариат Организации по запрещению химического оружия. 181 с. (Анон. 2005. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction (russian-language version). Printed and distributed by the Technical Secretariat of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. 181 p.)
- Войтенко Н. Г., Прокофьева Д. С., Гончаров Н. В. 2013. Токсикологическая характеристика 2,2'-дитиобис(N,N-диэтил)этанамин, продукта деструкции вещества типа VX. В кн.: Сборник трудов IV съезда токсикологов России. М. 137—138. (Voitenko N. G., Prokofieva D. S., Goncharov N. V. 2013. Toxicological characteristics of 2,2'-dithiobis(N,N-diethyl)ethanamine, the product of destruction of Russian VX. In: Proceedings of IV congress of toxicologists of Russia. Moscow. 137—138.)
- Гончаров Н. В., Сахаров И. Ю., Данилов С. М., Саканделидзе О. Г. 1987. Использование коллагеназы из гепатопанкреаса камчатского краба для выделения и культивирования эндотелиальных клеток крупных сосудов человека. Бюл. эксперим. биол. мед. 103 (9): 376—378. (Goncharov N. V., Sakharov I. Yu., Danilov S. M., Sakandelidze O. G. 1987. Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man. Biull. Eksp. Biol. Med. 104: 376—378.)
- Савельева Е. И., Зенкевич И. Г., Кузнецова Т. А., Радиллов А. С., Пшеничная Г. В. 2002. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии. Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева). 46 (6): 82—91. (Savelieva E. I., Zenkevich I. G., Kuznetsova T. A., Radilov A. S., Pshenichnaya G. V. 2002. Investigation of the products of destruction of warfare organophosphates with gas chromatography — mass-spectrometry. Mendeleev Chemistry J. (Zhurnal Ross. Khim. Ob-va im. D. I. Mendeleeva. 46 (6): 82—91.)

- Ahmad S., Ahmad A., Schneider K. B., White C. W. 2006. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells. *Int. J. Toxicol.* 25 : 17—23.
- Basha G., Yap P., Penninckx F. 1996. Comparative study of classical, colorimetric and immunologic staining methods for the assessment of tumor cell viability. *Tumour Biol.* 17 : 354—361.
- Bernas T., Dobrucki J. 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry.* 47 : 236—242.
- Berridge M. V., Tan A. S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303 : 474—482.
- Berridge M. V., Tan A. S., McCoy K. D., Wang R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica.* 4 : 14—19.
- Borenfreund E., Puerner J. A. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Methods.* 9 : 7—9.
- Bruggisser R., von Daeniken K., Jundt G., Schaffner W., Tulberg-Reinert H. 2002. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 68 : 445—448.
- Burdon R. H., Gill V., Rice-Evans C. 1993. Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radic. Res. Commun.* 18 : 369—380.
- Chakrabarti R., Kundu S., Kumar S., Chakrabarti R. 2000. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *J. Cell. Biochem.* 80 : 133—138.
- Collier A. C., Pritsos C. A. 2003. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem. Pharmacol.* 66 : 281—287.
- Cory A. H., Owen T. C., Bartrop J. A., Cory J. G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3 : 207—212.
- Crouch S. P., Kozlowski R., Slater K. J., Fletcher J. 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods.* 160 : 81—88.
- Danilov S. M., Allikmets E., Martynov A. 1984. Stimulation of cultured human vascular endothelial cell proliferation by growth factors from human brain, heparin and thrombin. *J. Cell Biol.* 99 : 274.
- Denizot F., Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 89 : 271—277.
- Funk D., Schrenk H. H., Frei E. 2007. Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *Biotechniques.* 43 : 178—182.
- Garbusov V., Rehfeld G., Wölm G., Golovnja R. V., Rothe M. 1976. Volatile sulfur compounds contributing to meat flavour. Part. I. Components identified in boiled meat. *Nahrung.* 20 : 235—241.
- Gimbrone M. A., Shefton E. J., Cruise S. A. 1978. Isolation and primary culture of endothelial cells from human umbilical vessels. *TCA Manual.* 4 : 813—817.
- Hiley R. W., Spikes H. A., Cameron A. 1981. Polysulfides as extreme-pressure lubricant additives. *Lubr. Eng.* 37 : 732—737.
- Huang K. T., Chen Y. H., Walker A. M. 2004. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *Biotechniques.* 37 : 406—412.
- Hutchison T. W. S. 1977. Onions as a cause of Heinz body anaemia and death in cattle. *Can. Vet. J.* 18 : 358—360.
- Ishikawa M., Yogita S., Takai S., Komi N., Makuuchi M. 1993. A new method for determining cellular ATP content in hepatocytes. *Tokushima J. Exp. Med.* 40 : 119—124.
- Jocelyn P. C. 1972. *Biochemistry of the SH group.* London: Acad. Press. 243 p.
- Jones D. P., Carlson J. L., Mody V. C., Cai J., Lynn M. J., Sternberg P. 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 28 : 625—635.
- Kangas J., Jäppinen P., Savolainen H. 1984. Exposure to hydrogen sulfide, mercaptans and sulfur dioxide in pulp industry. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45 : 787—790.
- Kangas L., Grönroos M., Nieminen A. L. 1984. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents *in vitro*. *Med. Biol.* 62 : 338—343.
- Kuzmits R., Aiginger P., Müller M. M., Steurer G., Linkesch W. 1986. Assessment of the sensitivity of leukaemic cells to cytotoxic drugs by bioluminescence measurement of ATP in cultured cells. *Clin. Sci. (London).* 71 : 81—88.
- Lawson L. D., Wang Z. J., Hughes B. G. 1991. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfonates in commercial garlic products. *Planta Med.* 57 : 363—370.
- Lee P. W., Allahyari R., Fukuto T. R. 1978. Studies on the chiral isomers of fonofos and fonofos oxen. III. *In vivo* metabolism. *Pestic. Biochem. Physiol.* 9 : 23—32.
- Lindl T., Lewandowski B., Schreyogg S., Staudte A. 2005. An evaluation of the *in vitro* cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. *Altern. Lab. Anim.* 33 : 591—601.
- Liu Y., Peterson D. A., Kimura H., Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* 69 : 581—593.
- Lupu A. R., Popescu T. 2013. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO<sub>2</sub> nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicol. In Vitro.* 27 : 1445—1450.
- Ly J. D., Lawen A. 2003. Transplasma membrane electron transport: enzymes involved and biological function. *Redox Rep.* 8 : 3—21.
- MacLeod G., Seyyedain-Ardebili M. 1981. Natural and simulated meat flavors (with particular reference to beef). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 14 : 309—437.
- Maioli E., Torricelli C., Fortino V., Carlucci F., Tommassini V., Pacini A. 2009. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. *Biol. Proced. Online.* 11 : 227—240.
- Marshall N. J., Goodwin C. J., Holt S. J. 1995. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 5 : 69—84.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 : 55—63.
- Munday R. 1982. Studies on the mechanism of toxicity of the mycotoxin, sporidesmin. I. Generation of superoxide radical by sporidesmin. *Chem. Biol. Interact.* 41 : 361—374.
- Munday R. 1989. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic. Biol. Med.* 7 : 659—673.
- Munday R. 2012. Harmful and beneficial effects of organic monosulfides, disulfides, and polysulfides in animals and humans. *Chem. Res. Toxicol.* 25 : 47—60.
- Munro N. B., Talmage S. S., Griffin G. D., Waters L. C., Watson A. P., King J. F., Hauschild V. 1999. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environ. Health Perspect.* 107 : 933—974.
- Murai T. 1977. Photodecomposition of 0-ethyl S,S-diphenyl phosphorodithiolate (edifenphos). *Agric. Biol. Chem.* 41 : 71—77.
- Natarajan M., Mohan S., Martinez B. R., Meltz M. L., Herman T. S. 2000. Antioxidant compounds interfere with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide cytotoxicity assay. *Cancer Detect. Prev.* 24 : 405—414.
- Nomura M., Minamino Y., Fujita K., Harada M. 1982. The role of chain transfer agents in the emulsion polymerization of styrene. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 20 : 1261—1270.
- O'Gara E. A., Hill D. J., Maslin D. J. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 2269—2273.
- Peng L., Wang B., Ren P. 2005. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf. Biointerfaces.* 45 : 108—111.



Rygle K. J., Feulmer G. P., Scheideman R. F. 1984. Gas chromatographic analysis of mercaptan odorants in liquefied petroleum gas. *J. Chromatogr. Sci.* 22 : 514—519.

Schutte L. 1974. Precursors of sulfur-containing flavor compounds. *Crit. Rev. Food Technol.* 4 : 457—505.

Stevens H. 1984. Suspected wild garlic poisoning in sheep. *Vet. Rec.* 115 : 363.

Takahashi S., Abe T., Gotoh J., Fukuuchi Y. 2002. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem. Int.* 40 : 441—448.

Vellonen K. S., Honkakoski P., Urtti A. 2004. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 : 181—188.

Vol'tsov A. A., Lyapina N. K. 1980. Organic sulfur compounds in condensates from the Orenburg and Sovkhonzensk fields. *Chem. Tech. Fuels Oils.* 16 : 266—270.

Wang P., Henning S. M., Heber D. 2010. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE.* 5 : e10202. doi: 10.1371/journal.pone.0010202.

Wang S., Yu H., Wickliffe J. K. 2011. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicol. In Vitro.* 25 : 2147—2151.

Zygmunt B., Wardencki W., Staszewski R. 1983. Gas chromatographic identification of thiols in the naphtha cut from Libyan crude oil. *J. Chromatogr.* 265 : 136—138.

Поступила 25 II 2014

#### EFFECTS OF BIOGENIC AND ABIOGENIC DISULPHIDES UPON ENDOTHELIAL CELLS IN CULTURE: COMPARISON OF THREE METHODS OF VIABILITY ASSESSMENT

D. S. Prokofieva,<sup>1,\*</sup> N. V. Goncharov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology  
and <sup>2</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;  
\* e-mail: darija-pl@yandex.ru

Effects of biogenic and abiogenic disulphides on viability of human umbilical vein endothelial cells in culture has been investigated using three methods: the neutral red uptake assay, quantification of intracellular ATP, and modifications of Mosmann method, the essence of which is the reduction of tetrazolium salts, MTT and MTS, by cells. 2,2'-dithio-bis(N,N-diethyl)ethanamine (DS) was used as an abiogenic disulphide. As for biogenic disulphides, we used GSSG and garlic oil (GO), the principal component of which is diallyl disulphide (DADS). It has been found that DS and GO have a similar cytotoxic effect upon the endothelial cells (EC<sub>50</sub> ~ 0.6 mM). GSSG in concentrations up to 1 mM did not effect the viability of endothelial cells. It has been demonstrated for the first time that DS and GO can serve as mediators of plasma membrane oxidoreductase activity, tetrazolium salts being as the substrate; this may cause false-negative effect. Thus, the Mosmann method has serious limitations when testing the cytotoxicity of disulphides, though can be used in studying the mechanism of action of disulphides.

**Key words:** disulfides, glutathione, garlic oil, endothelium, cytotoxicity.