

## ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ПУПЛОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

© А. Д. Надеев,<sup>1,\*</sup> И. В. Кудрявцев,<sup>2,3</sup> М. К. Серебрякова,<sup>2</sup> П. В. Авдонин,<sup>4</sup>  
В. П. Зинченко,<sup>1</sup> Н. В. Гончаров<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, 142290,

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины,  
Санкт-Петербург, 197376,

<sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091,

<sup>4</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, 119334,

<sup>5</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека  
ФМБА России, Санкт-Петербург, 188663, и <sup>6</sup>Институт эволюционной физиологии  
и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223;

\* электронный адрес: madeev1987@gmail.com

Проведена оценка соотношения раннего апоптоза и позднего апоптоза (некроза) в процессе гибели культивируемых эндотелиальных клеток пупочной вены человека при воздействии пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в условиях *in vitro*, максимально приближенных к физиологическим (высокая плотность клеток, высокое содержание сыворотки, концентрация  $H_2O_2$  не более 500 мкМ). Жизнеспособность клеток определяли с помощью проточной цитометрии и сочетанного применения флуоресцентных зондов PO-PRO-1, выявляющего гибнущие клетки начиная со стадии раннего апоптоза, и DRAQ7, окрашивающего клетки на финальной стадии апоптоза и некротические клетки. Полученные данные свидетельствуют о том, что первичным механизмом развития цитотоксического эффекта  $H_2O_2$  является апоптоз. Критической концентрацией  $H_2O_2$ , вызывающей гибель популяции клеток, находящихся в плотном монослое, является 250 мкМ. Меньшие концентрации  $H_2O_2$  (200 мкМ и ниже) обуславливают гибель отдельных клеток, однако жизнеспособность популяции эндотелиальных клеток в монослое сохраняется; реакция на агонисты, вызывающие мобилизацию внутриклеточного кальция, не изменяется по сравнению с контрольными клетками.

Ключевые слова: пероксид водорода, эндотелий, цитотоксичность, апоптоз, некроз.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, СОД — супероксиддисмутаза, PFS — фосфатно-солевой буферный раствор.

В начале 1930-х годов был впервые описан феномен окислительного (дыхательного) взрыва при фагоцитозе (Baldrige, Gerard, 1932). Эта работа положила начало многочисленным исследованиям роли активных форм кислорода (АФК) в биологических процессах и системах. Низкие концентрации АФК постоянно образуются практически во всех клетках организма и выполняют сигнальные функции в качестве вторичных посредников в редокс-чувствительных сигнальных путях (Ткачук и др., 2012; Надеев и др., 2014а). Образование АФК в высоких концентрациях является характерной функцией профессиональных фагоцитов — клеток врожденного иммунитета; в других клетках высокие концентрации АФК вызывают окислительный стресс, воспаление и гибель клеток. Окислительный стресс в клетках крови и сосудов повышает проницаемость гемато-тканевых барьеров, от уровня его интенсивности и продолжительности в существенной степени зависит развитие гипертензии и атеросклероза (Matsuda, Shimomura, 2013; Goncharov et al., 2015). АФК вносят решающий вклад в развитие патологии легких и

мозга при гипероксии и гипоксии (Gardner et al., 1994; Al Ahmad et al., 2012). Среди экзогенных источников АФК в кровеносном русле — гемоглобин эритроцитов, миелопероксидаза нейтрофилов, NADPH-оксидаза нейтрофилов, макрофагов и тромбоцитов (Martin-Ventura et al., 2012; Goncharov et al., 2015). Наиболее стабильной и важной формой АФК с точки зрения как токсичности, так и сигнализации считается пероксид водорода (Надеев и др., 2014а).  $H_2O_2$  образуется из супероксид-аниона в результате реакции дисмутации — спонтанной или катализируемой супероксиддисмутазами (СОД). Кроме того, в эндотелиальных и некоторых других клетках образование  $H_2O_2$  катализирует NADPH-оксидаза 4-го типа (Brandes et al., 2011). Экзогенный  $H_2O_2$  проникает в клетку посредством диффузии, однако недавние исследования показали, что важную роль в транспорте пероксида водорода через плазматическую мембрану играют аквапориновые каналы AQP3 и AQP8 (Miller et al., 2010; Viecelli Dalla Sega et al., 2014). Цитотоксическое действие  $H_2O_2$  на эндотелиальные клетки связывают с истощением внутри-

клеточного глутатиона, активацией редокс-чувствительных киназ p38 MAP, JNK и Akt, сигнального пути с участием NF- $\kappa$ B, повышением экспрессии альдозоредуктазы (Lee et al., 2004; Xie et al., 2015), уменьшением внутриклеточной концентрации сиртуина Sirt6, повышением экспрессии и активности  $\beta$ -галактозидазы; отмечены и изменения экспрессии эндотелиальной NO-синтазы eNOS (снижение) и белка p21 (повышение), дефосфорилирование и активация белков семейства ретинобластомы (Rb) (Liu et al., 2014).

Важно отметить, что исследования, в которых показаны эти и другие изменения, проводили с очень высокими концентрациями  $H_2O_2$  (0.5—3 мМ) и непродолжительном его действии (1—3 ч), регистрируя при этом апоптоз как основной тип гибели клеток (Chen et al., 2010; Sun et al., 2012; Xie et al., 2015). Через 1 сут и более после добавления  $H_2O_2$  в сверхвысоких концентрациях (миллимоли) отмечали исключительно некротический тип гибели эндотелиальных клеток (McKeague et al., 2003; Csordas et al., 2006). Однако в 1990 г. вышла работа с описанием модели *in vitro*, позволившей произвести количественную оценку предельных концентраций  $H_2O_2$  при взаимодействиях нейтрофилов с эндотелиальными клетками в условиях воспалительного и оксидативного стресса (Shappell et al., 1990). Было установлено, что концентрации экзогенного  $H_2O_2$ , поражающего эндотелий, могут достигать максимум 400—500 мкМ. Позднее в одной из многочисленных работ классика редокс-биологии Дина Джонса (Jones, 2008) был теоретически рассчитан предельный уровень эндогенно генерируемого  $H_2O_2$ , который удивительным образом совпал с данными, полученными в работе (Shappell et al., 1990) — 500 мкМ.

Несмотря на множество публикаций, посвященных исследованию сигнальных и токсических эффектов  $H_2O_2$  на клетки эндотелия, до сих пор нет полной ясности относительно концентрационной границы между обратимым действием  $H_2O_2$  (исключительно сигнальным) и необратимым (токсическим), а также относительно основного пути гибели клеток в условиях оксидативного стресса. Выводы об апоптозе как единственном пути гибели эндотелиальных клеток (Sun et al., 2012; Song et al., 2014) и выводы о некрозе клеток после воздействия  $H_2O_2$  (McKeague et al., 2003; Csordas et al., 2006) встречаются примерно с одинаковой частотой. Клетки, обработанные  $H_2O_2$ , постепенно утрачивают характерную для них полигональную форму и формируют вытянутые псевдоподии; межклеточные контакты разрываются, ядра набухают. Однако эти морфологические характеристики и даже применение различных тестов на жизнеспособность клеток не позволяют установить тип их гибели (Muzykantov et al., 1987; Прокофьева, Гончаров, 2014; Song et al., 2014). Не всегда можно понять, какое количество сыворотки присутствует (и присутствует ли вообще) в среде клеток, содержащей  $H_2O_2$ , какова плотность клеток и (или) их количество в лунке. Иногда выводы о механизмах гибели эндотелиальных клеток сделаны на основе исследований, проведенных на гораздо более устойчивых к действию  $H_2O_2$  эндотелиоподобных линиях (Sun et al., 2012). В связи с этим вопрос о том, где лежит граница между цитотоксическими концентрациями  $H_2O_2$  и теми, при которых проявляется его исключительно регуляторное действие как вторичного мессенджера в эндотелиальных клетках, является актуальным.

Цель данного исследования — в условиях, максимально приближенных к физиологическим (высокая

плотность эндотелиальных клеток, высокое содержание сыворотки в среде инкубации), выявить пороговые концентрации  $H_2O_2$ , при которых он начинает оказывать токсическое действие на эндотелиальные клетки пупочной вены человека, и определить соотношение раннего апоптоза и позднего апоптоза (некроза) в процессе их гибели.

## 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). Пупочную вену промывали раствором Хэнкса с антибиотиками, после чего заполняли средой 199, содержащей 0.1 % коллагеназы (Sigma, США), и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Полученные клетки промывали и выращивали в пластиковой посуде, предварительно покрытой 0.2 %-ным желатином (Sigma), используя среду 199, содержащую соли Эрла (Sigma), 20 % бычьей эмбриональной сыворотки (Invitrogen, США), 300 мкг/мл эндотелиальной ростовой добавки, полученной из мозга кролика по описанному методу (Maciag et al., 1979), 100 мкг/мл гепарина (Sigma) и 100 мкг/мл гентамицина (Sigma). Клетки идентифицировали по морфологическим критериям, экспрессии фактора VIII, ангиотензинпревращающего фермента, маркеров CD31, CD54, CD61 и ряда других (Кудрявцев и др., 2013). В работе использовали клетки 2—3-го пассажей, находящиеся в плотном монослое (около 100 тыс. кл./см<sup>2</sup>) в 24-луночных планшетах. Клетки культивировали в присутствии  $H_2O_2$  в течение 3 и 24 ч. Клетки снимали с помощью раствора аккутазы (Sigma). Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста, используя объектив с увеличением 10 $\times$ ; клетки фотографировали с помощью цифровой видеокамеры Penguin 150CL (Pixera, США; адаптер 1 $\times$ , матрица 1/2 $\times$  CCD, 1.5 млн пикселей) и программного обеспечения Видеотест-Размер 5.0.

**Определение типа клеточной гибели.** Для оценки жизнеспособности клеток и механизма их гибели мы проводили одновременное окрашивание их флуоресцентными красителями PO-PRO-1 и DRAQ7 с последующей регистрацией флуоресценции на цитофлуориметре Navios<sup>TM</sup> (Beckman Coulter, США). Красители PO-PRO-1 и DRAQ7 стехиометрически связываются с нуклеиновыми кислотами (Stemberger et al., 2010; Akagi et al., 2013). Подобного рода взаимодействия сопровождаются накоплением красителей в цитоплазме (после взаимодействия с РНК) и в ядре клетки (после взаимодействия с ДНК) и, как следствие, изменением флуоресценции после возбуждения светом с длинами волн 405 нм для PO-PRO-1 и 638 нм для DRAQ7 (эмиссия 455 и 695 нм соответственно). Однако существенное различие между этими красителями заключается в способности проникать в клетки. Краситель PO-PRO-1 относится к группе цианиновых красителей, за накопление которых внутри цитоплазмы отвечают лигандзависимые ионные каналы P2X7, относящиеся к семейству пуринорецепторов (Glisic-Milosavljevic et al., 2005; Stokes et al., 2006). В нормальных жизнеспособных клетках накопления PO-PRO-1 не происходит, так как эти каналы неактивны или обладают невысокой способностью транспортировать краситель. Однако их актива-

ция происходит при запуске апоптоза и по времени совпадает с нарушением асимметрии липидного состава поверхностной мембраны, что позволяет рассматривать накопление PO-PRO-1 в клетках в качестве события, характерного для ранних стадий апоптоза. Поэтому для выявления других стадий апоптоза, а не только констатации факта его запуска помимо PO-PRO-1 клетки дополнительно окрашивают вторым ДНК-связывающим красителем — DRAQ7, обладающим несколько иными свойствами. Краситель DRAQ7 не имеет каких-либо интегрированных в мембрану специфических переносчиков и может проникать в цитоплазму и ядро только через поврежденные мембраны, что обычно имеет место на финальных стадиях апоптоза при формировании апоптотических телец или при некрозе клеток. Таким образом, живые клетки в популяции не окрашиваются ни одним из упомянутых выше красителей. Клетки, вступившие в апоптоз, будут позитивны только по PO-PRO-1, тогда как клетки, находящиеся на более поздних стадиях апоптоза и некроза, будут эффективно окрашиваться обоими красителями.

Окрашивание клеток проводили в пробирках для проведения цитометрического учета  $12 \times 75$  мм (Beckman Coulter). Маточный раствор (100 мкМ) PO-PRO-1 (Invitrogen, США) готовили на ДМСО, аликвоты по 10 мкл хранили при  $-20$  °С. Рабочий раствор PO-PRO-1 готовили *ex tempore*, добавляя к 10 мкл маточного раствора 190 мкл PBS. К 100 мкл клеточной суспензии (2–3 млн кл./мл) добавляли 5 мкл рабочего раствора, получая рабочую концентрацию красителя 250 нМ. Затем в образцы вносили по 10 мкл раствора второго красителя DRAQ7 (Beckman Coulter) до конечной концентрации 3 мкМ. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 мин в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 15 тыс. одиночных клеток. Для дискриминации одиночных клеток от агрегатов использовали следующие сочетания сигналов: по светорассеянию напрямую (FS — величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (SS — величина, характеризующая форму клеток), интенсивность пикового сигнала против интенсивности интегрального по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигнала FS или SS. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter).

Для определения концентрации ионов кальция в цитоплазме ( $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ ) эндотелиальных клеток, выращенных в 96-луночном планшете, использовали флуоресцентный зонд CalciumGreen (ThermoFisher Scientific). Для загрузки клеток зондом их инкубировали в среде M199 в присутствии 1 мкМ CalciumGreen-AM и 0.01%-ного Pluronic F-127 при 37 °С в течение 1 ч. После этого к клеткам добавляли физиологический солевой раствор (PSS, pH 7.4), содержащий (в мМ): 145 NaCl, 5 KCl, 5 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> и 10 глюкозы. Предварительно их отмывали раствором PSS от среды M199 с флуоресцентным зондом. Флуоресценцию 6 лунок регистрировали параллельно при комнатной температуре с помощью планшетного спектрофлуориметра Synergy 2 (BioTech, США) при длинах волн возбуждения 485 и излучения 530 нм. В 3 лунках культивировали клетки, предварительно подвергнутые действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а в 3 других лун-

ках — контрольные клетки. Данные представлены как отношение прироста флуоресценции клеток в ответ на добавление агониста к их исходной флуоресценции.

## Результаты

Мы провели измерения параметров жизнеспособности эндотелиальных клеток после воздействия пероксида водорода. Как описано в разделе «Материал и методика», по определяемым параметрам клетки относили к следующим категориям: живые и неповрежденные, находящиеся на ранней стадии апоптоза, находящиеся на стадии некроза или позднего апоптоза. На рис. 1 представлены результаты эксперимента по определению зависимости типа клеточной гибели от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> через 3 ч после его внесения в среду инкубации. Показано разделение клеток на живые, находящиеся в стадии раннего апоптоза, и клетки с поврежденными мембранами, окрашенные обоими красителями. Последние представляют собой смесь некротических клеток и клеток в стадии позднего апоптоза. Из представленных гистограмм распределения клеток по флуоресценции PO-PRO-1 и DRAQ7 видно, что в отсутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> накопление красителей в клетках невелико, составляет менее 2 % (рис. 1) и, по всей вероятности, отражает спонтанный процесс гибели отдельных культивируемых клеток. При концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 мкМ никаких изменений нет. При действии 150 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> заметно увеличение числа клеток, вошедших в ранний апоптоз и поздний апоптоз (некроз). Процесс клеточной гибели резко усиливается при дальнейшем росте концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Распределение клеток по интенсивности флуоресценции зондов PO-PRO-1 и DRAQ7 на гистограммах при высоких (250 мМ и более) концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> дает основания предполагать, что некоторая часть из них гибнет по некротическому пути, минуя стадию апоптоза. Эти клетки окрашиваются зондом DRAQ7 и почти не окрашиваются PO-PRO-1. Другая часть клеток изначально включает PO-PRO-1 и уже после этого переходит в стадию позднего апоптоза и погибает, поглощая при этом зонд DRAQ7. Об этом свидетельствует наличие большого количества клеток, максимально окрашенных PO-PRO-1 и имеющих промежуточное и постепенно возрастающее окрашивание зондом DRAQ7.

На рис. 2 представлены обобщенные данные трех независимых экспериментов. Видно (рис. 2, а), что в течение 3 ч значимое влияние на жизнеспособность клеток H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оказывает в концентрации 250 мкМ и выше. Так, после 3-часового действия 250 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среднем 71 % клеток сохраняют жизнеспособность, 9 % находятся в стадии раннего апоптоза, а 20 % — в стадии позднего апоптоза или некроза. После воздействия 350 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> уже 22 % клеток находятся в раннем апоптозе, а 46 % — в стадии позднего апоптоза (некроза). Действие 500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводит к тому, что лишь 13 % клеток остаются живыми, 62 % погибают и окрашиваются обоими красителями, а 25 % находятся в ранней стадии апоптоза. Таким образом, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оказывает дозозависимое влияние на жизнеспособность эндотелиальных клеток. При этом для концентраций 250 мкМ и выше большая часть погибающих клеток (~2/3) имеет признаки позднего апоптоза или некроза, а меньшая часть клеток (~1/3) находится на стадии раннего апоптоза, когда еще сохраняется целостность плазматической мембраны.

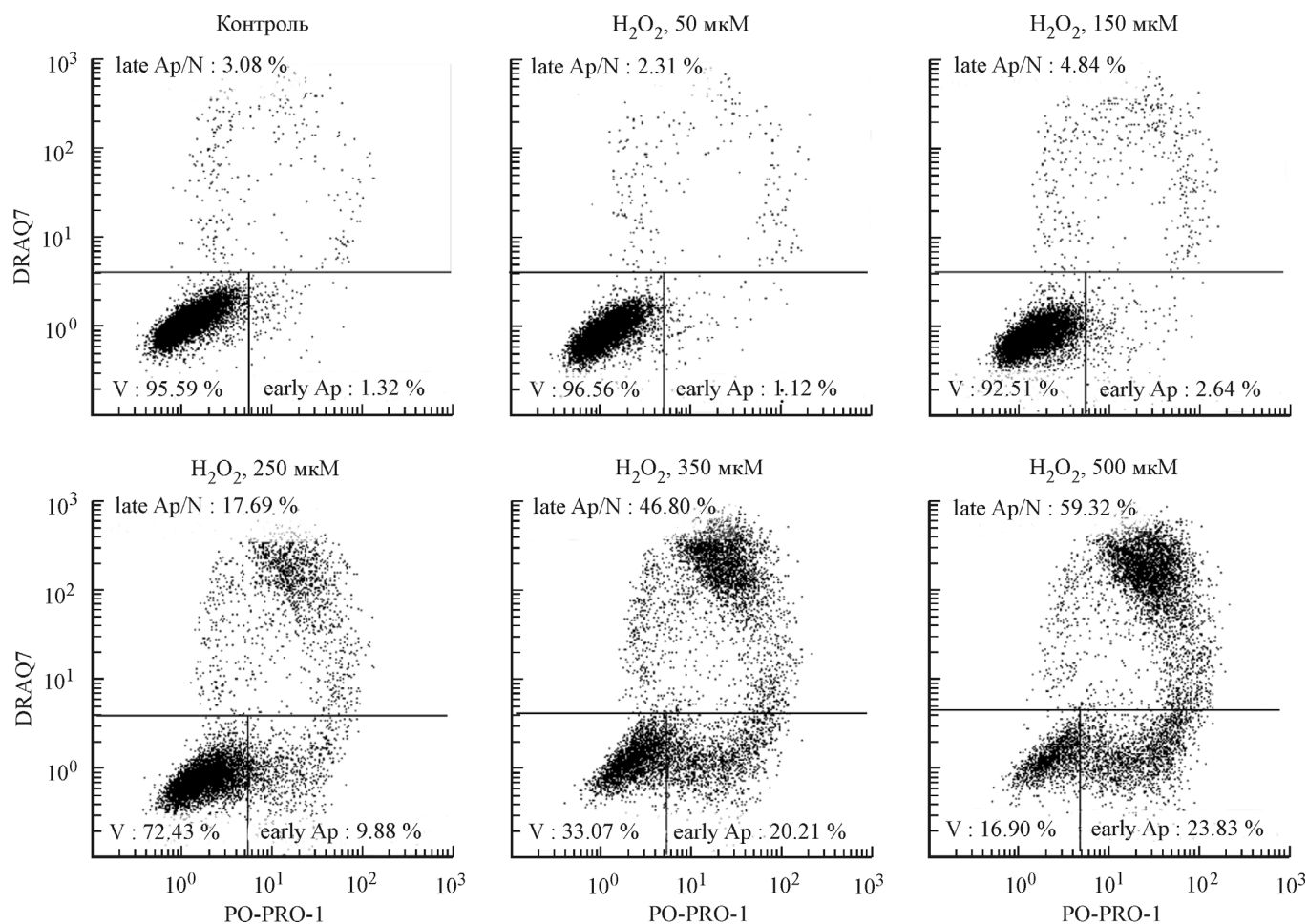


Рис. 1. Распределение эндотелиальных клеток по флуоресценции красителей PO-PRO-1 и DRAQ7 после действия различных концентраций  $H_2O_2$  в течение 3 ч.

«early Ap» — клетки в состоянии раннего апоптоза, «late Ap/N» — клетки в состоянии позднего апоптоза и (или) некроза, V — живые клетки.

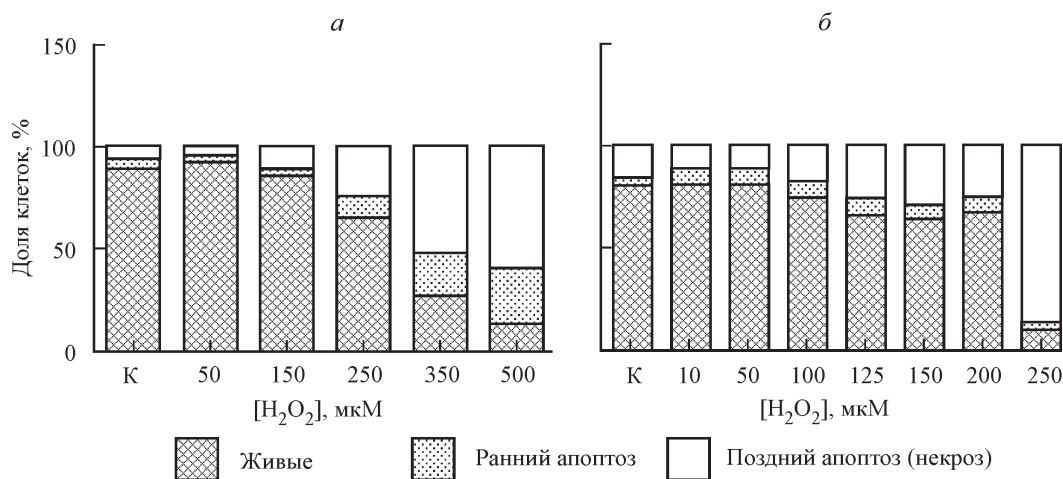


Рис. 2. Распределение клеток по стадиям апоптоза (некроза) через 3 (а) и 24 (б) ч действия  $H_2O_2$  в различных концентрациях. К — контроль.

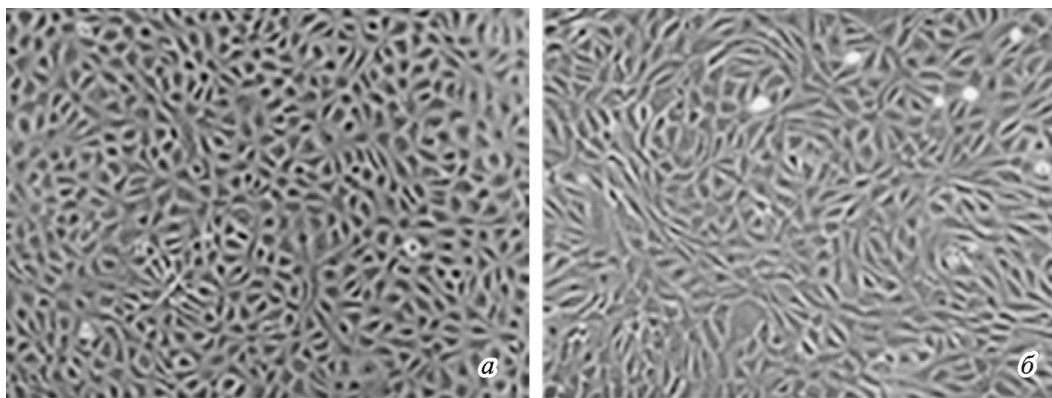


Рис. 3. Фотографии эндотелиальных клеток.

*a* — клетки в контроле, *б* — клетки через 1 сут после добавления в среду 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

На рис. 2, *б* показано состояние клеток через 24 ч после добавления в среду H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В концентрации 250 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает массовую гибель клеток, и лишь 11 % из них остаются живыми, причем подавляющее число гибнущих клеток находятся в стадии позднего апоптоза или некроза. При меньших концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> через 24 ч лишь 3—8 % клеток находятся в стадии позднего апоптоза (некроза) и 1—4 % — в раннем апоптозе.

Таким образом, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в физиологически обоснованных концентрациях в первые часы действия на плотный монослой эндотелиальных клеток (что тоже соответствует физиологическим условиям), находящихся в условиях с высоким содержанием сыворотки (20 %), индуцирует оба пути клеточной гибели, причем критической концентрацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является, по-видимому, концентрация 250 мкМ. При этой концентрации через 3 ч количество погибших клеток еще невелико (29 %), но процесс гибели клеток в популяции принимает необратимый характер и через 1 сут погибает уже 89 % клеток. При концентрации 200 мкМ и менее H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает, по-видимому, необратимые изменения только в отдельных клетках, не нанося се-

рьезных нарушений популяции в целом. По всей вероятности, погибшие клетки, составляющие небольшую часть от всей популяции, замещаются другими в результате пролиферации здоровых эндотелиальных клеток.

На рис. 3, *a, б* показаны фотографии эндотелиальных клеток, подвергнутых действию 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в сравнении с контрольными. Через 1 сут после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> морфология клеток в монослое меняется незначительно (клетки становятся слегка вытянутыми). Видны отдельные погибшие клетки в виде ярких сферических и полигональных образований на поверхности монослоя. Для оценки функциональных свойств эндотелиальных клеток после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> мы исследовали их кальциевые сигналы в ответ на следующие активаторы: гистамин, пептид Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN), являющийся агонистом PAR1 (рецепторов 1-го типа, активируемых протеазами), и веществ CGS12066B и BW723C86, являющихся агонистами серотониновых рецепторов соответственно 5HT1B и 5HT2B. Как показано на рис. 4, ответы эндотелиальных клеток на эти агонисты остались неизменными.

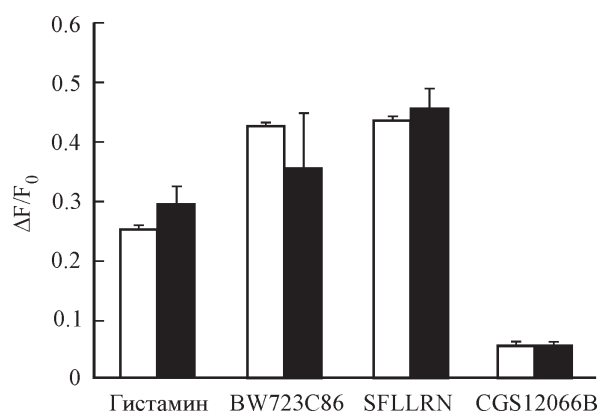


Рис. 4. Пиковый прирост ( $[Ca^{2+}]_{инт}$ ) в контрольных (белые столбцы) и обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (черные столбцы) эндотелиальных клетках в ответ на добавление 1 мкМ гистамина, 100 мкМ BW723C86 (агониста 5HT2B-рецепторов), 10 мкг/мл пептида SFLLRN (агониста рецепторов PAR1) и 50 мкМ CGS12066B (агониста 5HT1B-рецепторов).

По вертикали — отношение прироста флуоресценции клеток в ответ на добавление агониста к их исходной флуоресценции. Представлены средние значения со стандартной ошибкой из 3—6 параллельных измерений.

## Обсуждение

В одной из ранних работ, посвященных исследованию взаимодействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и эндотелиальных клеток в культуре (Muzykantov et al., 1988), было показано, что экзогенная каталаза, функционирующая в гидрофильной среде, не защищает эндотелиальные клетки от пероксида водорода, генерируемого глюкоксидазой в системе *in vitro*, что свидетельствует о быстром проникновении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетки с минимальной диффузией в гидрофильное окружение. Известно, что в физиологических условиях внеклеточные молекулы-восстановители, содержащиеся в плазме и сыворотке крови (цистеин, глутатионпероксидаза-3, параоксоназа-1 и альбумин), играют определенную роль в нейтрализации АФК (Magder, 2006; Zaki et al., 2014; Гончаров и др., 2015). Но все же главное значение для защиты от АФК в токсических концентрациях в кровеносных сосудах имеют системы антиоксидантной защиты эндотелиальных клеток и (или) эритроцитов (Muzykantov et al., 1987). Скорость нейтрализации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> эндотелиальными клетками зависит от условий культивирования и составляет 25—35 % за 1 ч при концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в пределах 0.3—3 мМ и плотности клеток  $1.4 \cdot 10^4$  в 200 мкл среды в лунке планшета (Muzykantov et al., 1987).

Полученные нами данные позволяют предположить, что относительно высокие и при этом физиологически обоснованные концентрации  $H_2O_2$  (250—500 мкМ) вызывают в популяции клеток развитие апоптоза и некроза, т. е. необратимые изменения, которые не могут быть восстановлены пролиферацией здоровых эндотелиальных клеток. Клетки, находящиеся в раннем апоптозе через 3 ч, через 24 ч переходят в стадию позднего апоптоза и некроза. Таким образом, при действии  $H_2O_2$  в концентрации 250 мкМ и выше апоптоз эндотелиальных клеток, находящихся в плотном монослое, можно зафиксировать лишь в течение нескольких часов. В то же время воздействие более низких концентраций  $H_2O_2$  вообще не приводит к развитию апоптоза в популяции клеток. Более того, мы установили, что кальциевые сигналы эндотелиальных клеток в ответ на агонисты гистаминовых, тромбиновых и серотониновых рецепторов остаются неизменными через 1 сут действия  $H_2O_2$  в подпороговой концентрации (200 мкМ). Эти данные представляются важными с точки зрения разработки адекватной модели *in vitro* для фенотипирования клеток, изучения посттрансляционных изменений, сигнальных и функциональных ответов в условиях оксидативного и других видов стресса (Терехина и др., 2012; Кудрявцев и др., 2013; Affara et al., 2013). Кроме того, эти данные могут иметь значение в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при сравнительном анализе эффективности антиоксидантов и интерпретации клинико-диагностических показателей эндотелиального генеза (Шмурак и др., 2012; Новожилов и др., 2013; Войтенко и др., 2015).

Ранее нами описан ряд изменений экспрессии поверхностных белков, которые могут иметь отношение к обратимым и необратимым процессам, связанным с развитием апоптоза и клеточной гибели. Мы показали, что через 3 ч действия 100—300 мкМ  $H_2O_2$  незначительно повышается (на 9—21 %) плотность экспрессии CD31 (PECAM-1), при действии 200—300 мкМ  $H_2O_2$  уменьшается (на 15—20 %) экспрессия CD309 (VEGFR-2/KDR), тогда как через 24 ч у живых эндотелиальных клеток дозозависимо повышается уровень CD54 (ICAM-1) наряду с умеренным усилением экспрессии всех других исследованных CD-маркеров (Кудрявцев и др., 2013). Физиологический смысл этих изменений состоит в том, что у клеток, вступивших в апоптоз, в первые часы действия  $H_2O_2$  в цитотоксической концентрации снижается рецепция фактора роста эндотелия, но вероятность их взаимодействия с тромбоцитами через CD31 (PECAM-1) повышается, и это может приводить к выбросу серотонина и запуску альтернативного механизма ангиогенеза (филогенетически более древнего) через активацию эндотелиальных рецепторов 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>1B</sub> и 5HT<sub>2B</sub> (Терехина и др., 2012; Надеев и др., 2014б; Profirovic et al., 2013). Через 1 сут действия  $H_2O_2$  у выживших клеток повышается вероятность взаимодействия с фактором роста и интегринами лейкоцитов CD11/CD18 и LFA-1 (Yang et al., 2005). В организме такое взаимодействие может привести к усилению генерации  $H_2O_2$  нейтрофилами, т. е. является одним из условий формирования положительной обратной связи (Shappell et al., 1990). Кроме того, активация эндотелия и моноцитов приводит к выбросу этими клетками эотаксина-1, одного из новых диагностических маркеров хронического воспаления (Войтенко и др., 2015). На клетках макрофагальной линии RAW264.7 показана возможность переключения пути гибели с некротического на апоптотический при действии  $H_2O_2$ , которую объясняют наличием отрицательной обратной связи между NF-κB и MAP-ки-

назами (Lin et al., 2010). Наши данные, так же как и данные из литературы, не позволяют сделать вывод о возможности такого переключения в эндотелиальных клетках.

Представленные данные и анализ литературы указывают на то, что  $H_2O_2$  вызывает в эндотелиальных клетках пупочной вены в условиях *in vitro* как проапоптотическое, так и пронекротическое действие. Первичным механизмом развития цитотоксического эффекта  $H_2O_2$  является, очевидно, апоптоз. Критической концентрацией  $H_2O_2$  для развития некроза и необратимой гибели клеток в популяции, находящейся в плотном монослое, является 250 мкМ; меньшие концентрации  $H_2O_2$  могут привести к необратимой гибели отдельных клеток, но не обуславливают гибель всей популяции эндотелиальных клеток в монослое.

Авторы выражают благодарность С. Н. Толмасову (Серпуховский родильный дом, Московская обл.) за неоценное содействие в предоставлении материала для выделения эндотелиальных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-01004).

#### Список литературы

- Войтенко Н. Г., Гарнюк В. В., Прокофьева Д. С., Гончаров Н. В. 2015. О новом скрининговом биомаркере для оценки состояния здоровья персонала предприятия по уничтожению химического оружия. Медицина труда и промышленная экология. 3 : 38—42. (Voitenko N. G., Garniuk V. V., Prokofieva D. S., Goncharov N. V. 2015. On new screening biomarker to evaluate health state in personnel engaged into chemical weapons extinction. Med. Tr. Prom. Ekol. (Russian). 3 : 38—42.)
- Гончаров Н. В., Белинская Д. А., Разыграев А. В., Уколов А. И. 2015. О ферментативной активности альбумина. Биорг. хим. 41 (2) : 131—144. (Goncharov N. V., Belinskaya D. A., Razygraev A. V., Ukolov A. I. 2015. On the enzymatic activity of albumin. Russ. J. Bioorg. Chem. 41 (2) : 113—124.)
- 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. Bull. Exp. Biol. Med. 104 (9) : 376—378.)
- Кудрявцев И. В., Гарнюк В. В., Надеев А. Д., Гончаров Н. В. 2013. Пероксид водорода модулирует экспрессию поверхностных антигенов эндотелиальными клетками пупочной вены человека при действии *in vitro*. Биол. Мембр. 30 (5—6) : 438—444. (Kudryavtsev I. V., Garniuk V. V., Nadeev A. D., Goncharov N. V. 2014. Hydrogen peroxide modulates expression of surface antigens by human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. Biochemistry (Moscow) Suppl. S. A: Membrane Cell Biol. 8 (1) : 97—102.)
- Надеев А. Д., Зинченко В. П., Авдонин П. В., Гончаров Н. В. 2014а. Токсические и сигнальные эффекты активных форм кислорода. Токсикологический вестник. 2 : 22—27. (Nadeev A. D., Zinchenko V. P., Avdonin P. V., Goncharov N. V. 2014. Toxic and signal properties of active forms of oxygen. Toxicol. Review (Russian). 125 (1) : 22—27.)
- Надеев А. Д., Жарких И. Л., Авдонин П. В., Гончаров Н. В. 2014б. Серотонин и рецепторы серотонина в клетках сердечно-сосудистой систем. Эксперим. и клин. фармакол. 77 (5) : 32—37. (Nadeev A. D., Zharkikh I. L., Avdonin P. V., Goncha-

- rov N. V. 2014. Serotonin and its receptors in the cardiovascular system. *Eksp. Klin. Farmakol.* (Russian) 77 (5) : 32—37.
- Новожилов А. В., Тавровская Т. В., Войтенко Н. Г., Гончаров Н. В., Маслова М. Н., Морозов В. И. 2013. Влияние антиоксидантов на состояние эритроцитов крыс в условиях истощающей беговой нагрузки. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 99 (10) : 1223—1232. (Novozhilov A. V., Tavrovskaya T. V., Voitenko N. G., Goncharov N. V., Maslova M. N., Morozov V. I. 2013. The effect of antioxidants on erythrocytes in rats during an exhaustive run. *Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* 99 (10) : 1223—1232.)
- Прокофьева Д. С., Гончаров Н. В. 2014. Действие биогенных и абиогенных дисульфидов на клетки эндотелия в культуре: сравнение трех методов оценки жизнеспособности. *Цитология.* 56 (6) : 410—418. (Prokof'eva D. S., Goncharov N. V., 2014. Effects of biogenic and abiogenic disulphides upon endothelial cells in culture: comparison of three methods of viability assessment. *Tsitologiya.* 56 (6) : 410—418.)
- Терехина И. Л., Надеев А. Д., Кожевникова Л. М., Гончаров Н. В., Авдонин П. В. 2012. 5HT1B- и 5HT2B-рецепторы вызывают увеличение концентрации ионов кальция в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов. *Патогенез.* 10 (1) : 70—72. (Terekhina I. L., Nadeev A. D., Kozhevnikova L. M., Goncharov N. V., Avdonin P. V. 2012. 5HT1B- and 5HT2B-receptors of serotonin stimulate increase in cytoplasmic calcium concentrations in vascular endothelial cells. *Patogenez (Pathogenesis).* 10 (1) : 70—72.)
- Ткачук В. А., Турин-Кузьмин П. А., Белоусов В. В., Воронников А. В. 2012. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. *Биол. мембр.* 29 (1—2) : 1—17. (Tkachuk V. A., Turin-Kuzmin P. A., Belousov V. V., Vorotnikov A. V. 2012. Hydrogen peroxide as a new second messenger. *Biol. Memb.* 29 (1—2) : 21—37.)
- Шмурак В. И., Курдюков И. Д., Надеев А. Д., Войтенко Н. Г., Глашкина Л. М., Гончаров Н. В. 2012. Биохимические маркеры интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами. *Токсикол. вестн.* 4 : 30—34. (Shmurak V. I., Kurdyukov I. D., Nadeyev A. D., Voitenko N. G., Glashkina L. M., Goncharov N. V. 2012. Biomarkers of intoxication by organophosphorous toxic agents. *Toxicol. Rev.* 4 : 30—34.)
- Affara M., Sanders D., Araki H., Tamada Y., Dunmore B. J., Humphreys S., Imoto S., Savoie C., Miyano S., Kuhara S., Jeffries D., Print C., Charnock-Jones D. S. 2013. Vasohibin-1 is identified as a master-regulator of endothelial cell apoptosis using gene network analysis. *BMC Genomics.* 14 : 23.
- Akagi J., Kordon M., Zhao H., Matuszek A., Dobrucki J., Errington R., Smith P. J., Takeda K., Darzynkiewicz Z., Wlodkovic D. 2013. Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7. *Cytometry A.* 83 : 227—234.
- Al Ahmad A., Gassmann M., Ogunshola O. O. 2012. Involvement of oxidative stress in hypoxia-induced blood-brain barrier breakdown. *Microvasc. Res.* 84 : 222—225.
- Baldrige C. W., Gerard R. W. 1932. The extra respiration of phagocytosis. *AJP-Legacy.* 103 : 235—236.
- Brandes R. P., Takac I., Schroder K. 2011. No superoxide — no stress? Nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 : 1255—1257.
- Chen J., Gu Y., Shao Z., Luo J., Tan Z. 2010. Propofol protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 339 : 43—54.
- Csordas A., Wick G., Bernhard D. 2006. Hydrogen peroxide-mediated necrosis induction in HUVECs is associated with an atypical pattern of caspase-3 cleavage. *Exp. Cell Res.* 312 : 1753—1764.
- 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.
- Gardner P. R., Nguyen D. D., White C. W. 1994. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 12 248—12 252.
- 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.
- Glisic-Milosavljevic S., Waukau J., Jana S., Jaiwala P., Rovensky J., Ghosh S. 2005. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods. *Cell Prolif.* 38 : 301—311.
- Goncharov N. V., Avdonin P. V., Nadeev A. D., Zharkikh I. L., Jenkins R. O. 2015. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 21 : 1134—1146.
- Jones D. P. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 : C849—C868.
- Lee Y. J., Kang I. J., Bünnger R., Kang Y. H. 2004. Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-kappaB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* 96 : 793—801.
- Lin X., Sun T., Cai M., Shen P. 2010. Cell-death-mode switch from necrosis to apoptosis in hydrogen peroxide treated macrophages. *Sci. China Life Sci.* 53 : 1196—1203.
- Liu R., Liu H., Ha Y., Tilton R. G., Zhang W. 2014. Oxidative stress induces endothelial cell senescence via downregulation of Sirt6. *Biomed. Res. Int.* 2014 : 902842.
- Magder S. 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit. Care.* 10 : 208.
- Martin-Ventura J. L., Madrigal-Matute J., Martinez-Pinna R., Ramos-Mozo P., Blanco-Colio L. M., Moreno J. A., Tarin C., Buriello E., Fernandez-Garcia C. E., Egido J., Meilhac O., Michel J. B. 2012. Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: detoxifying mechanisms and potential therapeutic options. *Thromb. Haemost.* 108 : 435—442.
- Matsuda M., Shimomura I. 2013. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes. Res. Clin. Pract.* 7 : e330—e341.
- McKeague A. L., Wilson D. J., Nelson J. 2003. Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines. *Br. J. Cancer.* 88 : 125—131.
- Miller E. W., Dickinson B. C., Chang. C. J. 2010. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 15 681—15 686.
- Muzykantov V. R., Sakharov D. V., Domogatsky S. P., Goncharov N. V., Danilov S. M. 1987. Directed targeting of immunoregulatory proteins provides local protection of endothelial cells from damage by hydrogen peroxide. *Amer. J. Pathol.* 128 : 276—285.
- Muzykantov V. R., Sakharov D. V., Sinitsyn V. V., Domogatsky S. P., Goncharov N. V., Danilov S. M. 1988. Specific killing of human endothelial cells by antibody-conjugated glucose oxidase. *Anal. Biochem.* 169 : 383—389.
- Profirovic J., Strelakova E., Urao N., Krbanjevic A., Andreeva A. V., Varadarajan S., Fukai T., Hen R., Ushio-Fukai M., Voino-Yasenetskaya T. A. 2013. A novel regulator of angiogenesis in endothelial cells: 5-hydroxytryptamine 4 receptor. *Angiogenesis.* 16 : 15—28.
- Shappell S. B., Toman C., Anderson D. C., Taylor A. A., Entman M. L., Smith C. W. 1990. Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J. Immunol.* 144 : 2702—2711.
- Song W., Pu J., He B. 2014. Tanshinol protects human umbilical vein endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 10 : 2764—2770.
- Stemberger J., Witt V., Printz D., Geyeregger R., Fritsch G. 2010. Novel single-platform multiparameter FCM analysis of apoptosis: significant differences between wash and no-wash procedure. *Cytometry A.* 77 : 1075—1081.
- Stokes L., Jiang L. H., Alcaraz L., Bent J., Bowers K., Fagura M., Furber M., Mortimore M., Lawson M., Theaker J., Laurent C., Braddock M., Surprenant A. 2006. Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. *Br. J. Pharmacol.* 149 : 880—887.
- Sun L., Yau H. Y., Wong W. Y., Li R. A., Huang Y. Yao X. 2012. Role of TRPM2 in H(2)O(2)-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS ONE.* 7 : e43186.

Vieceli Dalla Seg F., Zambonin L., Fiorentini D., Rizzo B., Caliceti C., Landi L., Hrelia S., Prata C. 2014. Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells. *Biochim. biophys. acta.* 1843 : 806—814.

Xie C. L., Hu L. Q., Pan Y. B., Qian Y. N. 2015. Propofol attenuation of hydrogen peroxide-induced injury in human umbilical vein endothelial cells involves aldose reductase. *Pharmazie.* 70 : 103—109.

Yang L., Froio R. M., Sciuto T. E., Dvorak A. M., Alon R., Lusinskas F. W. 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood.* 106 : 584—592.

Zaki M. E., El-Bassyouni H., Kamal S., El-Gammal M., Youness E. 2014. Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 18 : 340—344.

Поступила 11 IX 2015

#### DUAL PROAPOPTOTIC AND PRONECROTIC EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

A. D. Nadeev,<sup>1,\*</sup> I. V. Kudryavtsev,<sup>2,3</sup> M. K. Serebriakova,<sup>2</sup> P. V. Avdonin,<sup>4</sup>  
V. P. Zinchenko,<sup>1</sup> N. V. Goncharov<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, 142290,

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376,

<sup>3</sup> Far East Federal University, Vladivostok, 690091,

<sup>4</sup> N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, 119334,

<sup>5</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, St. Petersburg, 188663,

and <sup>6</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223;

\* e-mail: madeev1987@gmail.com

The ratio of early apoptosis and late apoptosis (necrosis) in the cultured human umbilical vein endothelial cells was estimated after exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) *in vitro* trying to keep them close to the physiological conditions (high cell density, high serum content, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration not over 500  $\mu$ M). Cell viability was assessed using flow cytometry and simultaneous staining with fluorescent dyes PO-PRO-1 to detect early apoptotic cells, and DRAQ7 to detect late apoptotic and necrotic cells. The data obtained suggest that the primary mechanism of cytotoxic response is apoptosis. The critical concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causing the death of the cell population in a dense monolayer is 250  $\mu$ M. Lower concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (up to 200  $\mu$ M) cause death of individual cells; however, viability of endothelial cell population is retained, and response to calcium activating agonists does not change compared with control cells.

Key words: hydrogen peroxide, endothelium, cytotoxicity, apoptosis, necrosis.