

животных. Эффекты, оказываемые каждой из этих молекул на живой организм хорошо известны и описаны, но механизм их взаимодействия друг с другом до конца не установлен. Имеются данные, что H₂S стимулирует образование фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [6]. Зная механизм действия VEGF на клетки эндотелия, можем предположить, что H₂S через VEGF активирует PI3K/Akt сигнальный путь, в результате чего происходит фосфорилирование и активация eNOS и увеличение продукции NO. Дискутабельным остается вопрос о причине увеличения продукции H₂S при блокаде одного из трех ферментов его *de novo* синтеза в сердечно-сосудистой системе. Возможно, происходит активация альтернативных путей синтеза сероводорода, или имеет значение антиоксидантная активность ПГ. Для подтверждения или опровержения данной гипотезы нами продолжена работа в этом направлении.

Литература

1. Ендотелійзалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння / М.М. Ткаченко [та ін.] // Фізіол. журн. – 2002. – 48, №4. – С. 3–13.
2. Вплив еналаприлу на синтез оксиду азоту, окисний метаболізм і тонус судин у старих щурів / В.Ф. Сагач [та ін.] // Фізіол. журн. – 2007. – 53, № 4. – С. 15–26.
3. Madhav, Lavu Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential / Madhav Lavu, Shashi Bhushan, David J. Lefer // Clin. Sci. – 2011. – 120. – P. 219–229.
4. Benjamin, L. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine / Benjamin L. Predmore, David J. Lefer, Gabriel Gojon // Antiox. Redox Signal. – 2012. – 17, №1. – P. 119–140.
5. Modified methylene blue method for measurement of hydrogen sulfide level in plasma / Zheng, Y [et al.] // Sheng Li Xue Bao. – 2012. – 64(6). – P. 681–686.
6. Bir S.C., Kolluru G.K., McCarthy P. Hydrogen Sulfide Stimulates Ischemic Vascular Remodeling Through Nitric Oxide Synthase and Nitrite Reduction Activity Regulating Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Angiogenesis // J. Am. Heart Assoc. – 2012. – 1(5).

СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ, СОХРАНЕННОГО НА ПОВЕРХНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО ФРАГМЕНТА СОСУДА

Паталах И.И., Таланов С.А., Сагач В. Ф.

*Институт биохимии имени О.В. Палладина НАН Украины, г. Киев
Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

Активация клеток эндотелиального слоя сосудистой стенки провоспалительными и прооксидантными агентами лежит в основе таких патологических изменений, как дезинтеграция эндотелия, усиление его адгезивных и агрегационных свойств, развитие провоспалительных ответных реакций. Активированные эндотелиоциты изменяют свой фенотип, теряя защитные функции и начиная продуцировать провоспалительные интерлей-

кины, ингибиторы и активаторы гемостаза, вазоактивные соединения и другие медиаторы [3]. Таким образом, моделирование нарушений сосудистой стенки, связанных с воспалением, образованием атеросклеротических бляшек или пристеночных тромбов обязательно должно включать стадию активации эндотелиальных клеток, а также количественную оценку клеточного ответа на действие активирующего агента.

Современные методы изучения функциональной активности эндотелиальных клеток разработаны, как правило, для работы с искусственно культивируемыми клетками [2]. Они позволяют легко изменять диапазон экспериментальных условий и регистрировать прямой клеточный ответ на стимулирующее воздействие, а также моделировать межклеточные взаимодействия аутокринного характера. Однако, эти методы не приспособлены для моделирования физиологической ответной реакции, которая формируется благодаря кооперативным взаимодействиям эндотелицитов с гладко-мышечными клетками и другими структурными элементами сосудистой стенки. Именно эти взаимодействия играют решающую роль в развитии процессов воспаления, тромбообразования и ремоделирования сосудистой стенки в условиях *in vivo*.

Соответственно, разработанный нами способ позволяет измерять интенсивность и продолжительность физиологической реакции эндотелия, сохраненного на изолированном фрагменте аорты крысы, которая формируется в ответ на действие активирующих агентов в условиях сохранения анатомической связи эндотелиального слоя клеток с другими структурными элементами сосудистой стенки.

Материалы и методы исследований. Работа была выполнена на фрагментах грудного отдела аорты (длина около 30 мм) крыс линии Вистар. Фрагмент сосуда, не очищенный от окружающих соединительных тканей, встраивали в систему замкнутой циркуляции с раствором Кребса так, чтобы не нарушить целостность эндотелия [1]. После 20-минутной инкубации и замены раствора Кребса аутосывороткой в систему вводили активирующие агенты: пероксид водорода (H_2O_2) или тромбин. Конечная концентрация пероксида водорода составляла 11 мкМ при однократном введении для моделирования острого воздействия или периодическом введении 4-хкратно через каждые полчаса для моделирования хронического воздействия. Для моделирования острого провоспалительного действия тромбина однократно вносили тромбин человека (Ренам, Россия) в концентрациях 3,5 и 7,0 НИЕ ед./мл. Активирующие агенты вносили в составе аутосыворотки, добавляемой в систему для восстановления уровня перфузата после очередного отбора проб. Объем пробы составлял 100 мкл.

Регистрировали время развития и амплитуду ответной реакции по количеству интерлейкина IL-6, секретированного эндотелиальными клетками в омывающий их поток аутосыворотки. Концентрацию IL-6, провоспалительного маркера активации эндотелиоцитов [4], определяли методом

твёрдофазного иммунного анализа с использованием тест-системы “Rat IL-6 HLIA” (Bender MedSystem GmbH, Austria).

Результаты и их обсуждение. Однократное введение H_2O_2 приводило к активации эндотелиоцитов, что проявлялось в повышении уровня IL-6. Активированное состояние эндотелия сохранялось не менее 90 мин с максимальной интенсивностью ответа на 60-й мин (рис, а). При периодическом введении H_2O_2 максимальный уровень продукции IL-6 был зарегистрирован уже через 40 мин и не снижался до конца эксперимента (в течение последующих 80 мин). Таким образом, предлагаемый способ позволил получить прямые доказательства способности H_2O_2 генерировать провоспалительную реакцию эндотелиальных клеток. При этом формируется устойчивый провоспалительный сигнал, поддерживающий активированное состояние эндотелия на протяжении всего времени регистрации.

В ответ на однократное введение тромбина в концентрации 7,0 НИЕд./мл продукция IL-6 эндотелием аорты постепенно усиливалась, достигая максимума на 90-й минуте, а затем быстро снижалась. Тромбин в концентрации 3,5 НИЕд./мл не приводил к активации эндотелия, уровень IL-6 существенно не отличался от фонового на протяжении всего периода экспозиции. По-видимому, провоспалительное действие тромбина на эндотелий проявляется лишь в случае избыточного его появления в кровотоке и может быть ограничено локальным непродолжительным влиянием на функциональную активность эндотелиоцитов. Возможно также, что слабая реакция эндотелиальных клеток аорты крысы в ответ на действие тромбина человека обусловлена видовой специфичностью подобного взаимодействия.

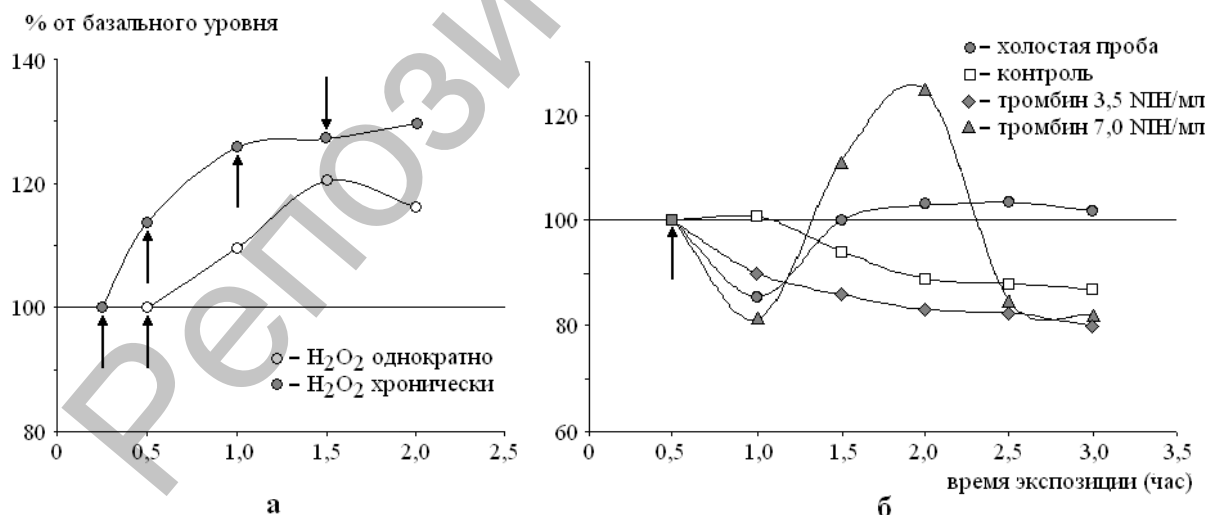


Рисунок. Изменение концентрации IL-6 в сыворотке крыс после внесения провоспалительных агентов: пероксида водорода (а) и тромбина человека (б). Контроль – система с фрагментом сосуда и циркуляцией сыворотки без внесения тромбина. Холодная проба – система циркуляции сыворотки, в которой фрагмент сосуда заменен равным по длине и диаметру отрезком соединительной трубки. Стрелками показано время внесения провоспалительного фактора.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет количественно оценивать степень активации и время сохранения провоспалительной активности клеток эндотелия путем регистрации изменения уровня провоспалительного маркера интерлейкина IL-6. Методика позволяет воспроизводить механизмы физиологической активации эндотелия для моделирования процессов воспаления, тромбообразования и тромболизиса в сосудистом русле.

Литература

1. Таланов, С.О. Пристрій для застосування ізольованих фрагментів судин у дослідженнях функцій активованого ендотелію / С.О. Таланов, І.І. Паталах, В.Ф. Сагач // Патент на корисну модель № 79918. – 13.05.2013.
2. Fadini, G.P. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology / G.P. Fadini, A. Avogaro // Cardiovascular Research. – 2010. – 87. – P. 12–21.
3. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I / P.E. Szmitko [et al.] // Circulation. – 2003. – 108. – P. 1917–1923.
4. Xin X. Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells / Xin X. [et al.] // Endocrinology. – 1995. – 136. – P. 132–137.

УСТРОЙСТВО ДЛЯ РАБОТЫ С ИЗОЛИРОВАННЫМИ ФРАГМЕНТАМИ СОСУДОВ, СОХРАНЯЮЩЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ

Таланов С.А., Паталах И.И., Сагач В.Ф.

Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев

Институт биохимии имени О.В. Палладина НАН Украины, г. Киев

Одной из проблем физиологии кровообращения является изучение реакции эндотелия на действие различных активирующих агентов. Современные методы моделирования подобного клеточного ответа предусматривают использование культуральной суспензии эндотелиоцитов либо их монослоя, сформированного на искусственной поверхности [1]. При этом игнорируется тот факт, что физиологический ответ эндотелия опосредован его кооперативным взаимодействием с другими анатомическими структурами сосудистой стенки, такими как гладкомышечный слой клеток и адвентиция. Препараты изолированных сосудистых полосок, широко используемые для исследования вазомоторных реакций, могли бы стать удачной альтернативой культуре клеток. Например, существует способ замкнутой перфузии инвертированного фрагмента сосуда, позволяющий сохранять его вазомоторную функцию, а также поддерживать заданные параметры инкубации в течение нескольких часов [2]. К сожалению, подготовка фрагмента сосуда для данного способа перфузии приводит к частичной или полной его деэндотелизации, а сам способ не предусматривает возможность контроля физиологического состояния эндотелия.