

## ЦЕЛОСТНОСТЬ И БАРЬЕРНАЯ ФУНКЦИЯ МАКРОСОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ НЕ НАРУШАЮТСЯ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ *in vitro*

© 2023 А.Ю. Хапчаев\*, О.А. Антонова, О.А. Казакова, М.В. Самсонов, А.В. Воротников, В.П. Ширинский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, Институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, 121552 Москва, Россия; электронная почта: AYKhapchaev@cardio.ru

Поступила в редакцию 13.01.2023

После доработки 08.07.2023

Принята к публикации 11.07.2023

Гипергликемия является отличительной чертой сахарного диабета 2-го типа (СД2), связанной с дисфункцией эндотелия сосудов и сердечно-сосудистыми осложнениями. Многие исследования *in vitro* обнаружили апоптоз эндотелиальных клеток как ранний результат экспериментальной гипергликемии и обозначили гибель клеток как ключевой фактор повреждения сосудов при СД2. Однако в условиях *in vivo* апоптоз не наблюдается вплоть до поздних стадий развития СД2. В данной работе мы исследовали долгосрочные (до 4 недель) эффекты высокой концентрации глюкозы (HG, 30 мМ) на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES). HG не изменяла морфологию эндотелиального монослоя, уровень продукции АФК и NO и оказывала лишь незначительное влияние на маркеры апоптоза. Реакции эндотелиального барьера на различные воздействия не отличались от реакции клеток, культивируемых при физиологическом уровне глюкозы (LG, 5 мМ). Фокусируясь на ключевых регуляторах сократительной активности цитоскелета и эндотелиального барьера, мы не выявили различий в индуцированных гистамином изменениях внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина или фосфатазы легких цепей миозина. Полученные нами результаты показывают, что эндотелиальные клетки сосудов могут хорошо переносить относительно длительное воздействие HG, и нужны дальнейшие исследования для изучения механизмов развития сосудистых нарушений при прогрессирующем СД2.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** HUVES, эндотелиальный барьер, гипергликемия, инсулин, АФК, NO, РЛЦ миозина, MYPT1.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080079, **EDN:** IJZJNE

### ВВЕДЕНИЕ

Гипергликемия является основным признаком сахарного диабета 2-го типа (СД2), связанным с дисфункцией клеток эндотелия сосудов [1, 2] и сердечно-сосудистыми осложнениями [3–6]. Макрососудистые осложнения являются основной причиной заболеваемости и смертности при диабете [7]. Предполагается, что окислительный стресс является объединяющим механизмом эндотелиальной дис-

функции, вызванной гипергликемией [8–10]. Поскольку эндотелиальные клетки сосудов малодоступны *in vivo*, их изучают *in vitro* путем выделения и культивирования в монослое [11, 12]. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) являются наиболее распространенной моделью сосудистого эндотелия *in vitro* [13, 14]. Они часто используются при изучении влияния экспериментальной гипергликемии на функции эндотелия (см. обзор Vorotnikov et al. [15]). Многие авторы отмечают

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; РЛЦ – регуляторные легкие цепи миозина; СД2 – сахарный диабет 2-го типа; ЕВМ – базальная среда для культивирования клеток эндотелия; ЕGM – среда для роста эндотелиальных клеток; HG – высокая концентрация глюкозы; HUVES – эндотелиальные клетки пупочной вены человека; LG – нормальная концентрация глюкозы; MLCK – киназа легкой цепи миозина; MYPT1 – миозин-связывающая субъединица-1 миозинфосфатазы; ROCK – RhoA-ассоциированная протеинкиназа; TER – трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

\* Адресат для корреспонденции.

апоптоз и гибель клеток как ранний и общий ответ клеток на высокий уровень глюкозы во внешней среде (HG) [8, 16]. Однако в отсутствие сопутствующих патологий HG может длительно сохраняться у диабетиков без выраженного апоптоза эндотелиальных клеток [17–19]. Такое несоответствие требует изучения с использованием протоколов длительного культивирования эндотелиальных клеток *in vitro*.

До сих пор в большинстве эндотелиальных протоколов *in vitro* использовалась кратковременная (обычно от 1–2 до 7 дней) обработка клеток HG (см. обзор Vorotnikov et al. [15]) с идеей, что чрезмерно высокий уровень глюкозы (25–30 мМ) отражает результат длительного воздействия более низких концентраций глюкозы *in vivo*. Продолжительное (7–14 дней) культивирование HUVEC было использовано в лаборатории Ceriello [20, 21] для изучения более выраженных эффектов осцилляций глюкозы по сравнению с постоянной HG. Тем не менее даже в этом случае (через 14 дней) постоянная HG существенно не повышала уровня маркеров апоптоза. Применение краткосрочных протоколов при отсутствии морфологических наблюдений *in vitro* не позволяет оценить способность эндотелиального монослоя противостоять апоптотическому повреждению.

Физический барьер между кровью и прилегающими тканями является одной из основных функций эндотелия сосудов [22]. Различные патологические состояния (например, СД2) и стрессоры, такие как активные формы кислорода (АФК) или медиаторы воспаления (например, гистамин), могут нарушать целостность эндотелиального монослоя [23–25], что ведет к повышению проницаемости сосудов и развитию отека. Сокращение эндотелиальных клеток и образование межклеточных зазоров зависит от активности миозина II [26], которая регулируется фосфорилированием его регуляторных легких цепей (РЛЦ) с участием ионов  $Ca^{2+}$  [27] или  $Ca^{2+}$ -независимых механизмов [28, 29]. Основными киназами РЛЦ являются  $Ca^{2+}$ -зависимая киназа легких цепей миозина (MLCK) и  $Ca^{2+}$ -независимая RhoA-ассоциированная киназа (ROCK) [30, 31]. Они совместно противодействуют активности фосфатазы легких цепей миозина (MLCP) [32]. Благодаря своей регуляторной миозин-связывающей субъединице MYPT1, MLCP высоко специфична к миозину и является единственной известной фосфатазой миозина в эндотелиальных клетках [33, 34]. Тогда как роль MLCK, ROCK и MLCP в регуляции гиперпроницаемости эндотелия доказана [34–37], их реакции на HG не исследованы.

Предиабетическая резистентность к инсулину ведет к развитию гиперинсулинемии. Однако, в отличие от известных неблагоприятных эффектов HG на эндотелиальный барьер, инсулин оказывает вазопротекторное действие при воспалении [38] и ослабляет сердечно-сосудистые осложнения у диабетиков [39]. В эндотелиальных клетках микрососудов *in vitro* инсулин стабилизирует эндотелиальный барьер за счет инактивации сократительного аппарата клеток [40]. Эта работа, по-видимому, является единственным исследованием влияния инсулина на фосфорилирование миозина в эндотелиальных клетках.

В настоящем исследовании мы использовали долгосрочные протоколы культивирования HUVEC с постоянной HG для изучения изменений в морфологии монослоя HUVEC, маркеров воспаления и апоптоза, барьерных свойств, развития окислительного стресса, реакций на инсулин и другие стимулы, вызывающие транзиторную проницаемость, а также для оценки влияния HG на фосфорилирование миозина и фосфатазы миозина. В целом, мы не обнаружили существенного влияния экспериментальной гипергликемии на функциональные свойства монослоя HUVEC.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Общие реагенты, желатин и человеческий инсулин («Sigma», США) использовали, как описано ранее [41, 42]. Стандартизованная базовая среда для поддержания эндотелиальных клеток (EBM) и среда для роста эндотелиальных клеток (EGM) были получены от «Cell Application» (США, #210-500); глутамин, пенициллин и стрептомицин — от «Gibco» (США); гистамин — от «Sigma»; Fluo-4 AM (#F14201) — от «Life Technologies» (США); DAF-FM-DA (4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеин диацетат) — от «Invitrogen» (США) и DCF-DA (2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетат) — от «Sigma». Для вестерн-блоттинга использовали следующие антитела: фосфо-eNOS(Ser1177) (#612392) и eNOS (#N30020L14) — «BD Biosciences» (США); моно-фосфо-РЛЦ (Ser19) (#3675), ди-фосфо-РЛЦ (S19/T18) (#3674) и антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (#7074) — «Cell Signaling» (США); анти-MYPT1 (#sc-25618), фосфо-MYPT1(S695) (#sc-337531), фосфо-MYPT1(T696) (#sc-17556), фосфо-MYPT1(T853) (#sc-17432), анти-ROCK1 (#sc-5560) и анти-ROCK2 (#sc-5561) — «Santa

Cruz Biotechnology» (США); анти-винкулин («Abcam», США; #ab18058), анти-ГАФД (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа) («Merck», США; #MAB374), анти-РЛЦ («ProteinTech», США; #10324-1-AP), антитела кролика против иммуноглобулинов мыши («Sigma»; #A9044), фосфо-ROCK2(S1366) («Invitrogen»; #PA5-34895). Биотинилированные моноклональные антитела 10F3B2 против молекулы клеточной адгезии ICAM-1 [43], набор для определения аннексина Annexin-V:FITC («Bio-Rad», США; #ANNEX100F) и набор для определения активной каспазы-3 (Active Caspase-3 FITC Mab Apoptosis Kit I, «BD Biosciences»; #550480) использовали для проточной цитофлуориметрии. Для иммунохимии использовали препараты Alexa-fluor 488-конъюгированный фаллоидин («Invitrogen»; #A-12379), DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; «Molecular Probes» (США); #D-1306), первичные антитела против VE-кадгерина («MyBioSource», США; #MBS176401) и конъюгированные с Alexa-fluor 594 вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика («Invitrogen»; #R37119). Набор ингибиторов протеаз и фосфатаз «Halt Protease and phosphatase inhibitor cocktail» («Thermo Fisher Scientific», США) использовали при лизисе клеток, Clarity ECL («Bio-Rad») – для получения изображений после вестерн-блоттинга. HUVEC были получены от трех здоровых доноров (от каждого донора объединяли равное количество клеток), и во всех экспериментах использовали клетки третьего пассажа.

**Поддержание монослоев HUVEC.** HUVEC культивировали в покрытых 0,2%-ным желатином 24-луночных планшетах («SPL», Южная Корея) в среде роста EGM с добавлением 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, как описано ранее [42]. Среда роста заменяли через день. Фазово-контрастную микроскопию проводили сразу после смены среды с использованием инвертированного микроскопа Nikon Diaphot («Nikon», Япония), снабженного камерой Nikon D40 («Nikon»). Полученные изображения обрабатывали с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

**Проницаемость монослоя HUVEC.** Для определения проницаемости монослоя HUVEC измеряли трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TER), как описано ранее [41, 42], с использованием прибора ECIS-z («Applied Biophysics», США). Клетки высевали в лунки планшетов 8W10E («Applied Biophysics»), предварительно покрытых 0,2%-ным желатином, по  $1,8 \times 10^5$  клеток на лунку в 400 мкл

среды EGM с добавлением 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Непрерывный мониторинг TER начинали сразу в многочастотном режиме, который переключали на 16 кГц через 10 дней, чтобы регистрировать быстрые реакции на гистамин. После формирования прочного монослоя (значение TER 15–16 кОм) в питательную среду дополнительно добавляли 25 мМ D-глюкозы до конечной концентрации 30 мМ (экспериментальная гипергликемия, HG) и/или 1 нМ инсулина (экспериментальная гиперинсулинемия); контрольные клетки культивировали в среде EGM (5 мМ D-глюкозы, LG). Значения TER регистрировали в течение трех недель. Среда заменяли через день, поддерживая указанные концентрации глюкозы и/или инсулина.

**Измерение продукции NO.** Клетки HUVEC высевали в 96-луночные микропланшеты с черными стенками и плоским дном (μclear black, Cellstar, TC, F-bottom; «Greiner Bio-One», Австрия), покрытые 0,2%-ным желатином, по  $0,5 \times 10^5$  клеток на лунку, в 100 мкл среды EGM с добавлением 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. После формирования монослоя клеткам создавали условия гипергликемии и/или гиперинсулинемии, как это описано выше. Для измерения уровня NO клетки инкубировали 30 мин в 100 мкл свежей среды EGM, содержащей 2 мМ DAF-FM-DA, 1 мМ пробенецид («Invitrogen») и 15 мМ HEPES. Затем среду заменяли на 100 мкл среды EGM, содержащей только 1 мМ пробенецида и 15 мМ HEPES. Флуоресценцию DAF измеряли на микроскопе AxioVert 200M, снабженном камерой High Speed AxioCam HSm cooled CCD («Zeiss», Германия). Базальную флуоресценцию DAF в нестимулированных клетках считали фоновой флуоресценцией. В соответствующие ячейки добавляли инсулин до конечной концентрации 10 нМ. Сигналы флуоресценции DAF были получены при 10-кратном увеличении и включали 200–400 клеток в поле зрения. Изображения получали каждые 10 мин в течение 40–60 мин при минимальной интенсивности освещения, используя время экспозиции 0,8 с, чтобы свести к минимуму эффекты обесцвечивания. Все значения флуоресценции нормализовали к средней фоновой флуоресценции, которую определяли перед добавлением инсулина, и к количеству клеток. Подтверждали линейный характер кинетики накопления флуоресценции DAF, и по ее линейным участкам рассчитывали значения тангенса, соответствующего скорости выделения NO [42].



**Измерение продукции АФК.** HUVEC культивировали в 96-луночных микропланшетах, как указано выше, с добавлением или без 25 мМ глюкозы и/или 1 нМ инсулина. Перед измерением АФК среду заменяли на ЕВМ на 1 ч, затем на ЕВМ, содержащую 10 мкМ DCF-DA, на 60 мин, затем на ЕВМ на 30 мин, после чего клетки помещали на 30 мин в раствор Хэнка, содержащий 15 мМ HEPES. Интенсивность флуоресценции DCF измеряли на планшетном ридере Victor X3 («Perkin Elmer», США). Параллельно определяли фоновую флуоресценцию в клетках, не обработанных DCF-DA; эти значения вычитали из значений флуоресценции клеток, обработанных DCF-DA. Результаты выражали как разницу флуоресценции DCF в клетках, подвергнутых воздействию HG и/или инсулина, и в контрольных клетках, нормализованную к таковой в контрольных клетках [42].

**Определение концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>.** HUVEC культивировали в 8-луночных камерах («Ibidi», Германия), предварительно покрытых 0,2%-ным желатином, как описано выше. В среду добавляли Fluo-4 AM на 20 мин до конечной концентрации 1 мкМ, затем добавляли 10 мМ HEPES. Флуоресценцию Fluo-4 измеряли, как указано выше, при минимальной интенсивности освещения на микроскопе AxioVert 200M, оснащенный высокоскоростной охлаждаемой камерой и встроенным термостатом, отрегулированным до 37 °С. Изображения получали с 10-секундными интервалами. Через 2 мин после начала записи к клеткам вносили 10 мкМ гистамина. Полученные данные обрабатывали с помощью модуля Physiology программного обеспечения AxioVision 4.8.2 («Zeiss») и с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ.

**Иммунофлуоресценция и проточная цитофлуориметрия.** HUVEC культивировали в покрытых желатином 8-луночных камерах («Ibidi») в условиях LG или HG в течение 10 дней при смене среды роста клеток через день. Клетки фиксировали в 3,7%-ном формальдегиде в фосфатном солевом растворе (PBS) в течение 5 мин и обрабатывали 0,1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 5 мин. Фиксированные клетки блокировали в 1%-ном БСА в течение 1 ч и инкубировали сначала с первичными антителами кролика против VE-кадгерина, затем со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa-fluor 594 (для окраски VE-кадгерина), и с фаллоидином, конъюгированным с Alexa-fluor 488 (для окраски F-актина); для визуализации клеточных ядер использовали DAPI. Флуоресценцию регистрировали на микроскопе Leica Stellaris 5 при 40-кратном

увеличении, изображения обрабатывали с помощью бесплатного программного обеспечения LAS X 3.7.6.25997 («Leica Microsystems CMS GmbH», Германия), GIMP 2.10.34 и ImageJ.

Проточный цитофлуориметр FACSCanto II («Becton Dickinson», США) использовали для определения экспозиции на поверхности клеток провоспалительного маркера (ICAM-1), или раннего маркера апоптоза (фосфатидилсерин) [44, 45], или внутриклеточного специфического маркера апоптоза (активированной каспазы-3) [46]. Через 2 дня после последней замены среды в каждой пробе анализировали не менее 3000 клеток. Для этого собирали клеточную среду с открепившимися клетками и осаждали клетки путем низкоскоростного центрифугирования. Прикрепленные клетки снимали раствором трипсин/ЭДТА (0,02%/0,05%). Для каждой лунки эти две клеточные фракции объединяли и делили на три части: 1) для определения ICAM-1, 2) для определения фосфатидилсерина (путем связывания аннексина V) и окрашивания пропидий иодидом, 3) для определения активированной каспазы-3. Последующие процедуры выполняли в соответствии с инструкциями производителя и как это было описано ранее [47].

**Вестерн-блоттинг.** Клетки HUVEC выращивали до достижения монослоя в чашках диаметром 35 мм, предварительно покрытых 0,2%-ным желатином в среде EGM, как описано выше, в условиях LG или HG, без или с добавлением инсулина. Клетки стимулировали гистамином (10 мкМ) в течение разного времени, после чего клеточную среду удаляли, клетки быстро промывали ледяным PBS и лизировали в 2-кратном буфере Лэммли для образцов, содержащем также набор ингибиторов протеаз и коктейль с ингибиторами фосфатаз. Лизаты клеток 10 раз пропускали через иглу шприца 30G для разрушения ДНК, нагревали при 56 °С в течение 30 мин и центрифугировали при 16 000 g (4 °С, 10 мин). Вестерн-блоттинг проводили, как описано ранее [41, 42], с использованием прибора Criterion («Bio-Rad») при 0,4 А·ч для переноса белков на поливинилиденфторидные мембраны («Millipore», США). Мембраны инкубировали с сайт-специфическими или независимыми от фосфорилирования антителами, а затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой. Разные формы РЛЦ визуализировали последовательно на одной и той же мембране после стрипирования антител, как описано ранее [48]. Изображения получали, обрабатывали и анализировали с помощью реагентов Clarity ECL, прибора Fusion-SL 3500WL («Vilber Lourmat»,

Франция) и программы ImageJ; уровни содержания общего белка в образцах нормализовали по винкулину и ГАФД. Для сравнения разных наборов образцов в гели загружали эталонные образцы.

**Статистическая обработка результатов.** Полученные данные анализировали с использованием двустороннего U-критерия Манна–Уитни с уровнем значимости 0,05. Для проведения множественных сравнений применяли критерий Крускала–Уоллиса, а затем – апостериорный критерий Данна с использованием поправки Бонферрони. Данные представлены в виде диаграмм «ящик с усами» (box-and-whisker) или среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), как указано в подписях к рисункам. Эксперименты проводили не менее чем в двух повторах и повторяли  $n$  раз, как указано в подписях к рисункам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

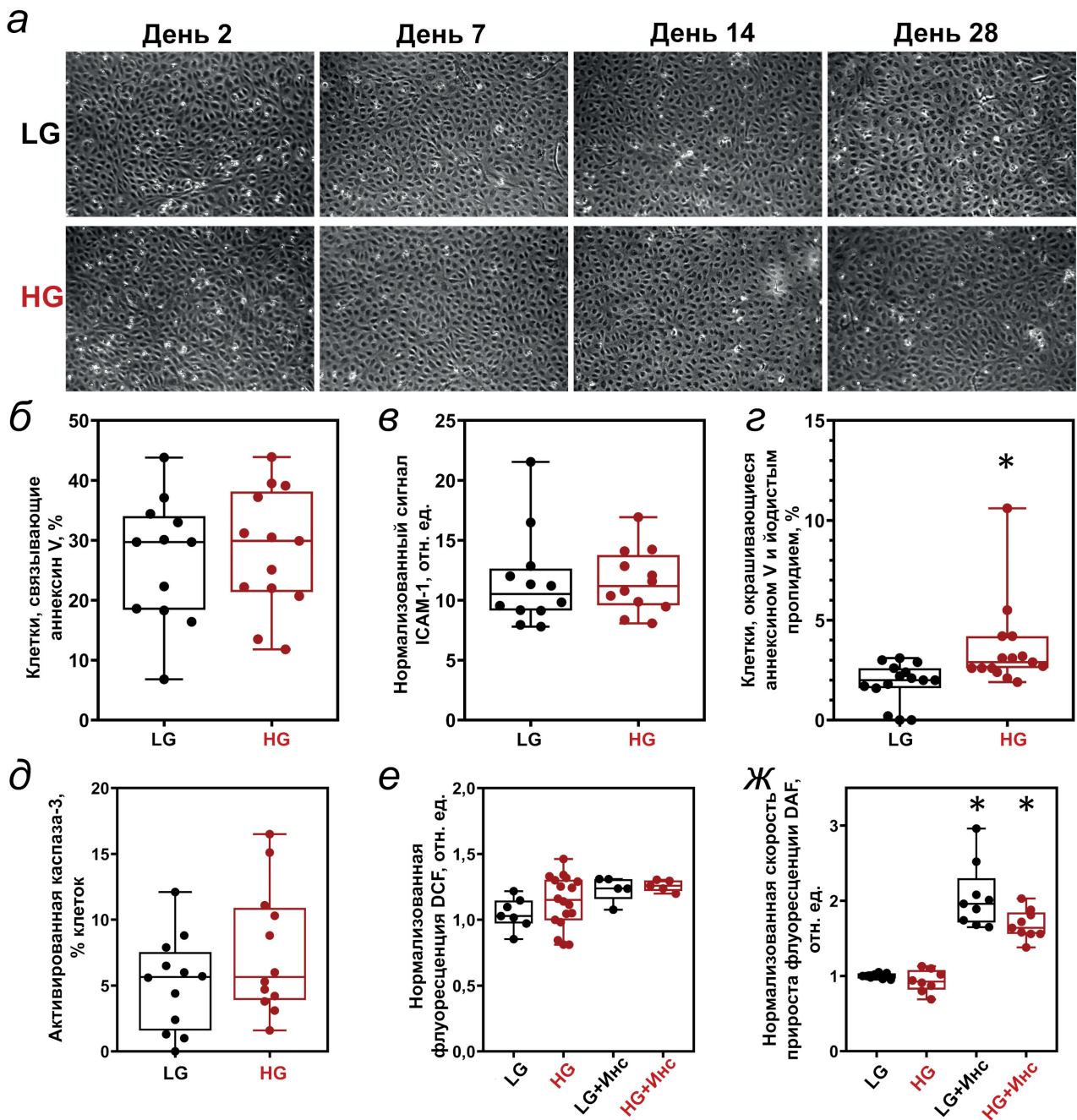
В работе были использованы долгосрочные протоколы культивирования HUVEC без пересева клеток и с заменой питательной среды через день. Для сравнения с результатами других исследований, измерения NO и АФК, маркеров апоптоза и уровня фосфорилирования белков проводили через 5 дней после воздействия HG на клетки. Остальные эксперименты проводили, используя длительные протоколы (три и более недели), для мониторинга состояния клеточного монослоя, эндотелиального барьера и кальциевых ответов.

**HG не влияет на морфологию монослоя HUVEC и продукцию АФК и NO.** Световая микроскопия показала, что эндотелиальный монослой сохранял классический вид «булыжной мостовой», который не изменялся при воздействии HG в течение 4 недель (рис. 1, *а*). Мы не обнаружили существенных изменений в экспозиции провоспалительного фосфатидилсерина (рис. 1, *б*) или молекулы клеточной адгезии ICAM-1 (рис. 1, *в*) на поверхности клеток через 5 дней воздействия HG. Значимое различие по сравнению с контрольными клетками (хотя всего лишь  $3,00 \pm 0,99\%$  против  $2,08 \pm 0,78\%$ ) было обнаружено для дважды положительных по аннексину V и йодиду пропидия клеток (рис. 1, *г*), что указывает на инициацию апоптоза в этих клетках [44]. Хотя количество клеток, положительных по активированной каспазе-3, истинному маркеру апоптоза [46], было заметно выше в условиях HG (рис. 1, *д*), в среднем оно не превышало 6% от всей клеточной популяции, и эти различия не достигали статисти-

ческой значимости. Уровень АФК, измеренный на 5-й день воздействия HG, также был выше, но статистически не отличался от такового в контрольных клетках, культивированных в LG (рис. 1, *е*). Наконец, ни базальная, ни стимулированная инсулином продукция NO не изменялись под действием HG (рис. 1, *ж*). В целом, эти результаты показывают, что длительная экспериментальная гипергликемия не нарушает целостность монослоя HUVEC, а также не увеличивает продукцию АФК или NO в течение срока воздействия HG, обычно используемого в других работах. Далее мы исследовали барьерные свойства монослоя HUVEC и его реакции на различные стрессоры.

**HG не влияет на эндотелиальный барьер HUVEC.** Эндотелиальный барьер регистрировали непрерывно по трансэндотелиальному электрическому сопротивлению (TER). На рис. 2, *а* и *б* показаны репрезентативные записи TER, полученные в течение первых 10 дней после посева клеток и последующих 10 дней соответственно. Через 2 дня барьер полностью укрепился и значения TER стабилизировались на уровне 16–18 кОм. После этого инициировали экспериментальную гипергликемию и/или гиперинсулинемию. В отдельных экспериментах, показанных на рис. 2, *а*, HG умеренно снижала уровень TER примерно на 10%, но затем TER постепенно восстановился до значений, наблюдаемых до инициации HG и в LG. В других экспериментах (не показано) начальное падение уровня TER не было очевидным.

Во всех культурах HUVEC наблюдалось резкое падение значений TER после каждой смены среды, после чего уровень TER восстанавливался до исходных значений в течение последующих нескольких часов. Эти изменения, вызванные свежей средой, были более выражены в клетках, находящихся в условиях HG, но на 10-й день их амплитуда сравнялась с таковой в контрольных клетках. После этого номинальные значения TER клеток в условиях HG демонстрировали тенденцию к превышению показателей контрольных (LG) клеток при сохранении схожей динамики (рис. 2, *б*). В течение этого периода мы исследовали реакции TER на различные стрессоры, такие как напряжение сдвига, вызванное повторным пипетированием среды, стимуляцию гистамином (10 мкМ) (рис. 2, *б*), или  $\alpha$ -тромбином (100 нМ) (рис. 2, *д*), или клеточным голоданием (среду не меняли 3 дня) (рис. 2, *е*). После каждого воздействия проводили замену среды на свежую для удаления остаточных эффектов стрессорного агента. Очевидно, что HG существенно не изменяла ответы TER на напряжение сдвига,

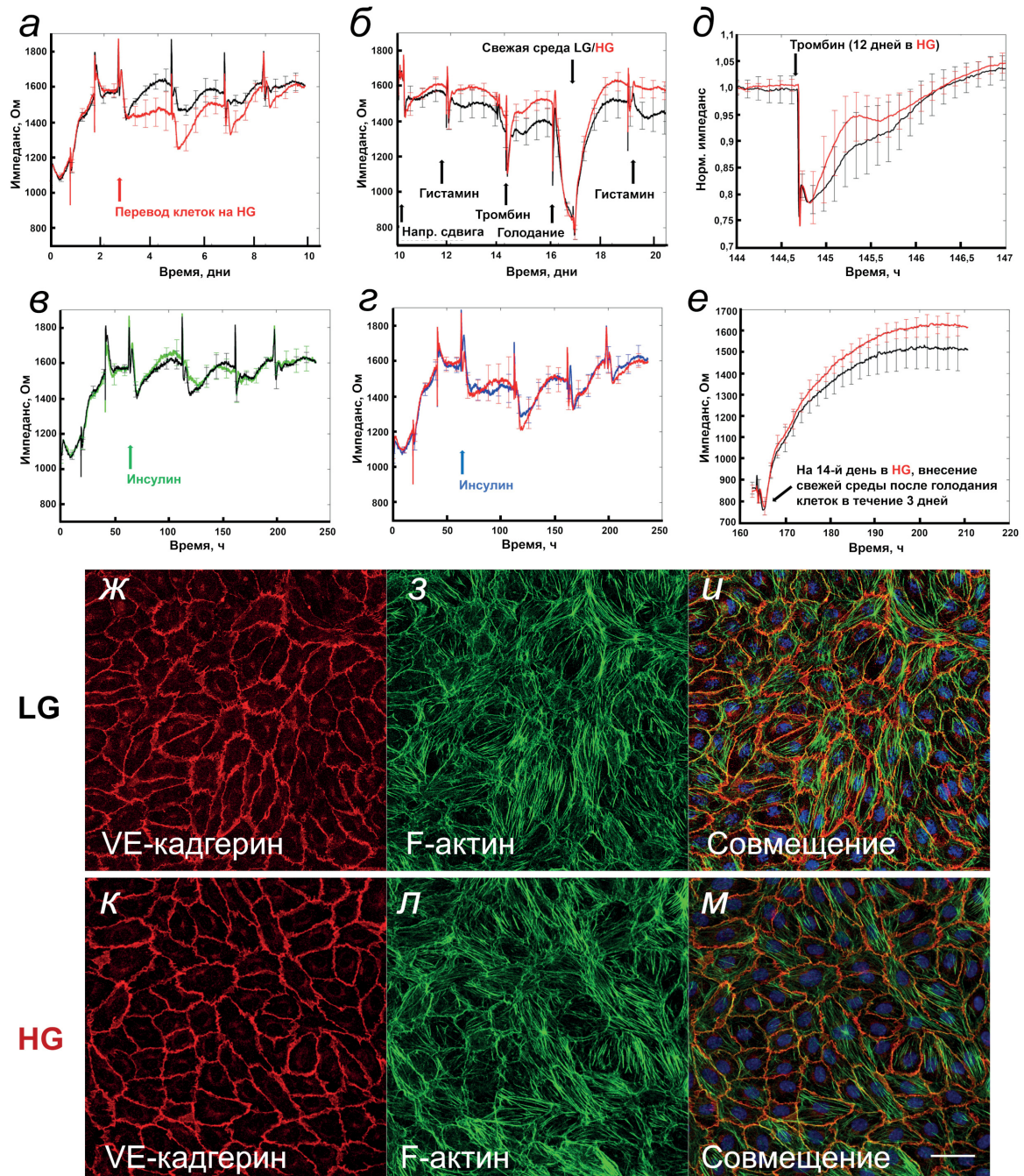


**Рис. 1.** Влияние экспериментальной гипергликемии на морфологию монослоя HUVEC (*a*), провоспалительные маркеры (*б* и *в*), маркеры апоптоза (*г* и *д*), продукцию АФК (*е*) и NO (*ж*). Клетки культивировали в обычной среде EGM (LG) или EGM с добавлением 25 мМ глюкозы (HG) в течение 4 недель (*a*) или 5 дней (*б–ж*), как указано. *a* – Репрезентативные фазово-контрастные изображения клеточных монослоев, полученные после замены клеточной среды. Провоспалительное состояние клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии через 2 дня после последней замены культуральной среды: *б* – по экспозиции фосфатидилсерина (связывание аннексина V); *в* – по экспрессии молекул адгезии ICAM-1 на внешней поверхности плазматической мембраны. Апоптоз HUVEC измеряли по доле клеток, дважды положительных по аннексину V и йодистому пропидию (PI) (*г*) или положительных по активированной каспазе-3 (*д*). Данные представлены в виде диаграмм, показывающих межквартильный диапазон (*б–ж*) и выраженных в процентах клеток, положительных по соответствующему маркеру (*б, г, д*), или в виде сигнала флуоресценции, нормализованного относительно сигнала в контрольных (LG) образцах (*в, е, ж*). Инсулин (1 нМ) присутствовал в течение всего периода (*е*) или был внесен однократно на 30 мин (*ж*), где это указано (+ Ins). \*  $p = 0,0056$  (*г*),  $p = 0,00012$  (*ж*, LG + Ins),  $p = 0,0015$  (*ж*, HG + Ins) по сравнению с соответствующими контролями,  $n = 4–5$

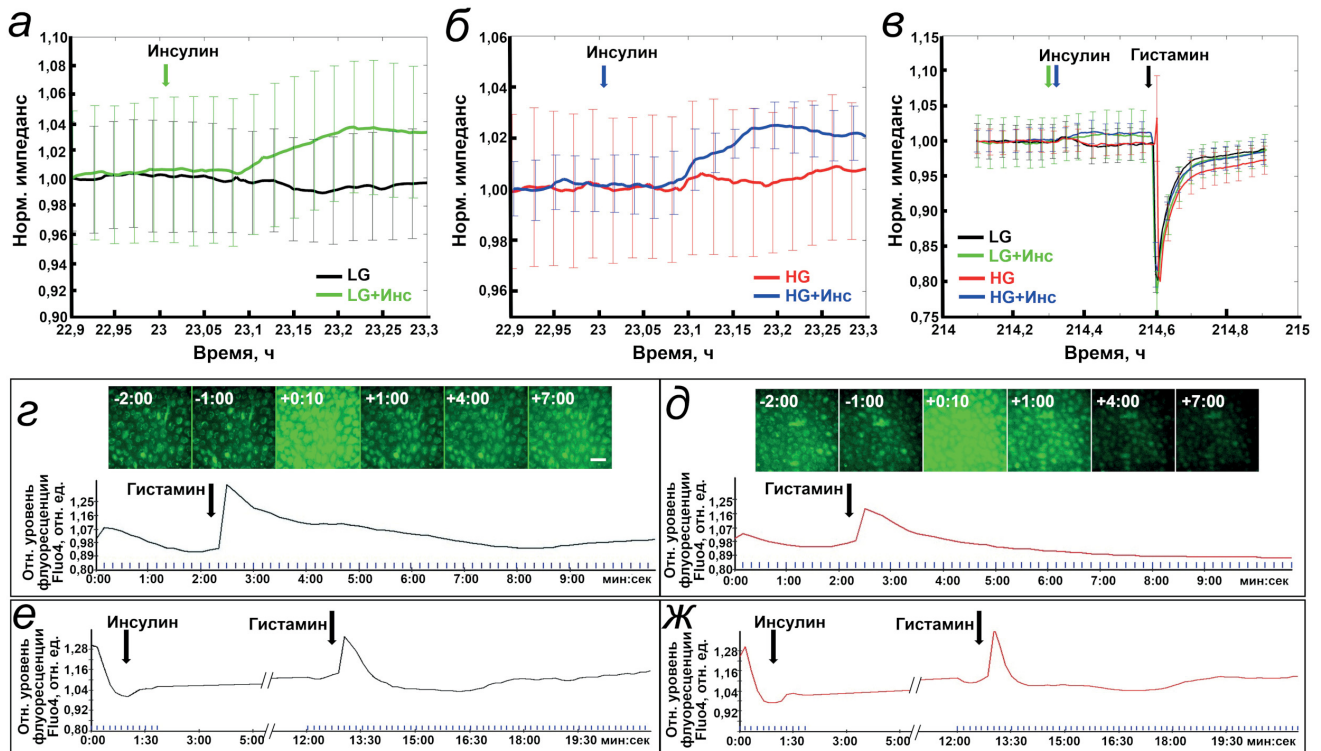
гистамин или  $\alpha$ -тромбин, восстановление после голодания, т.е. ответы были сходными по длительности и амплитуде. Экспериментальная гиперинсулинемия также не повлияла на реак-

ции TER ни контрольных клеток (рис. 2, *в*), ни клеток в условиях HG (рис. 2, *г*). Окрашивание VE-кадгерина (рис. 2, *ж* и *к*) и актинового цитоскелета (рис. 2, *з* и *л*) в клетках, находившихся





**Рис. 2.** Длительная экспериментальная гипергликемия и/или гиперинсулинемия существенно не влияют на базовое электрическое сопротивление эндотелиального барьера HUVEC и его реакции на стресс. Трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TER) монослоя HUVEC регистрировали непрерывно при частоте 16 кГц в условиях низких (LG, 5 мМ) или высоких концентраций глюкозы (HG, 30 мМ) и/или инсулина (1 нМ). Смену среды проводили через день или сразу после получения реакции на стрессовый стимул. *а* – Записи TER в условиях HG (красная кривая) и LG (черная кривая) за первые 10 дней после посева клеток; HG инициировали через 62 ч после посева (красная стрелка). *б* – Записи TER для последующих 10 дней, как продолжение записи на панели (*а*). Стрелками отмечены реакции на указанные стрессоры. *в* и *г* – Записи TER за первые 10 дней после посева клеток в присутствии 1 нМ инсулина (момент добавления отмечен стрелкой на 62 ч) для имитации гиперинсулинемии в LG (*в*), зеленая кривая, или в HG (*г*), красная кривая). *д* и *е* – Клетки культивировали в условиях LG (черная кривая) или HG (красная кривая) и измеряли ответы TER на воздействие 100 нМ  $\alpha$ -тромбина (*д*) или как восстановление после голодания (*е*) в моменты времени, отмеченные соответствующими стрелками на панели (*б*). Чтобы упростить сравнение, на панели (*д*) приведены нормализованные значения TER, где фактические значения TER составляли ~14 кОм как для условий LG, так и для HG. Каждая кривая представляет собой среднее электрическое сопротивление монослоя с планками погрешностей, указывающими стандартные отклонения на основе 8 (*а*, *б*, *д*, *е*) или 4 (*в*, *г*) измерений в параллельных лунках. *ж–м* – Флуоресцентные изображения HUVEC, культивированных в течение 10 дней в условиях LG (*ж–и*) или HG (*к–м*) и окрашенных антителами к VE-кадгерину (панели *ж* и *к*; красный) или фаллоидином на F-актин (*з* и *л*; зеленый), а также DAPI для визуализации ядер клеток (*и* и *м*; синий). Объединенные изображения представлены на панелях *и* и *м*. Шкала – 50 мкм



**Рис. 3.** HG и инсулин не влияют на транзиторные реакции  $[Ca^{2+}]_{in}$  и эндотелиального барьера HUVEC в ответ на гистамин. *a–в* – Клетки культивировали в состоянии монослоя в условиях LG (*a*) или HG (*б*) и стимулировали на 11-й день 10 нМ инсулина, демонстрируя отсутствие различий между LG и HG. После такой же однократной стимуляции клеток инсулином на 20-й день проводили последующую стимуляцию гистамином (10 мкМ), которая вызывала одинаковые транзиторные ответы TER (*в*). Показаны репрезентативные нормализованные записи TER; его фактические значения составляли ~14–15 КОМ для всех кривых. Каждая кривая представляет среднее электрическое сопротивление монослоя с планками погрешности, указывающими значения стандартной ошибки среднего (SEM) для четырех параллельных измерений. *г–ж* – HUVEC культивировали в состоянии монослоя в условиях LG (*г* и *е*) или HG (*д* и *ж*) в течение 10 дней, инкубировали с Fluo-4 AM и стимулировали гистамином (10 мкМ) в момент времени 0:00 (мин:с) или инсулином (1 нМ), как указано стрелками. На верхних панелях (*г* и *д*) показаны репрезентативные необработанные изображения флуоресценции Fluo-4 в одном поле зрения в указанные моменты времени. Кривые в нижней части панелей показывают динамику флуоресценции Fluo-4

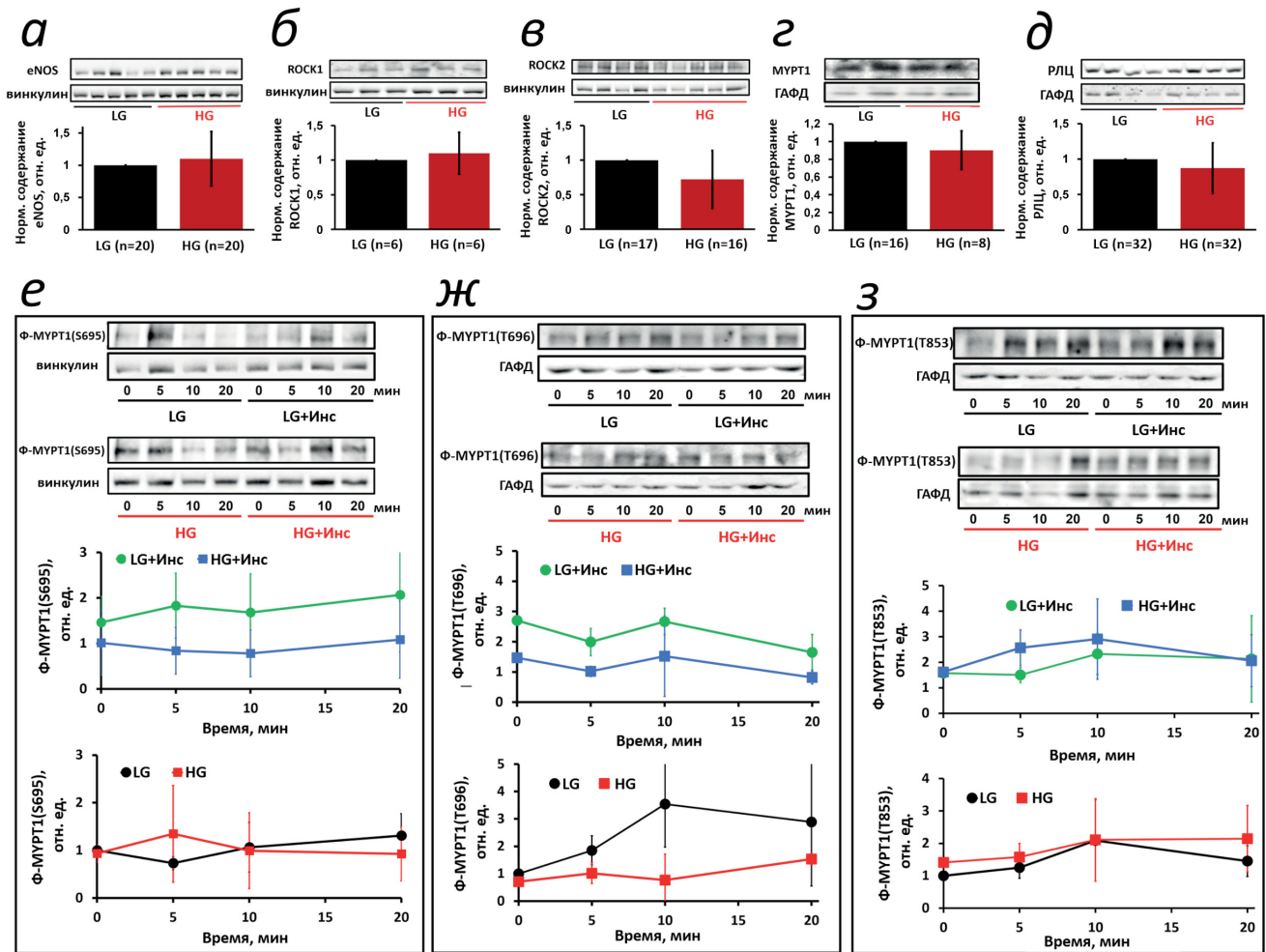
в условиях LG или HG в течение 10 дней, также не показало повреждающего эффекта HG на межклеточные контакты. В целом, эти результаты не выявили существенного влияния длительной HG на целостность барьера и функцию монослоя HUVEC *in vitro*.

**Инсулин не влияет на изменения внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  и эндотелиальный барьер HUVEC в ответ на действие гистамина.** Тогда как длительная экспериментальная гиперинсулинемия не влияла на эндотелиальный барьер HUVEC (рис. 2, *в* и *г*), мы проверили гипотезу о том, влияет ли инсулин на мобилизацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_{in}$ ) и проницаемость монослоя HUVEC в ответ на гистамин. Однократная стимуляция инсулином вызывала небольшие изменения TER, показывающие, что клетки реагировали на инсулин (рис. 3, *a–в*). Однако инсулин не изменял транзиторной реакции TER на гистамин, независимо от того подвергались ли клетки воздействию HG или нет (рис. 3. *в*). Соответственно,

ни инсулин, ни HG не влияли на повышение  $[Ca^{2+}]_{in}$ , вызванное гистамином. Типичный профиль  $[Ca^{2+}]_{in}$ , регистрируемый с помощью зеленого флуоресцентного кальциевого зонда Fluo-4 (рис. 3, *г* и *е*), оставался неизменным для всех клеток независимо от HG или инсулина (рис. 3, *е* и *ж*). Примечательно, что спонтанные колебания  $[Ca^{2+}]_{in}$  происходили случайным образом в отдельных нестимулированных клетках. Гистамин увеличивал флуоресценцию Fluo-4 одновременно во всех клетках в течение 10–20 с, после чего интенсивность флуоресценции возвращалась к исходному уровню. В целом, эти результаты показывают, что длительная HG не влияет на всплески  $[Ca^{2+}]_{in}$  и проницаемость барьера HUVEC в ответ на гистамин.

**HG не изменяет содержания и уровня фосфорилирования цитоскелетных мишеней.** Кроме быстрого  $Ca^{2+}$ -зависимого воздействия на TER, гистамин вызывает в эндотелиальных клетках более длительные сигнальные реакции, которые могут влиять на барьерную функцию клеток [28].



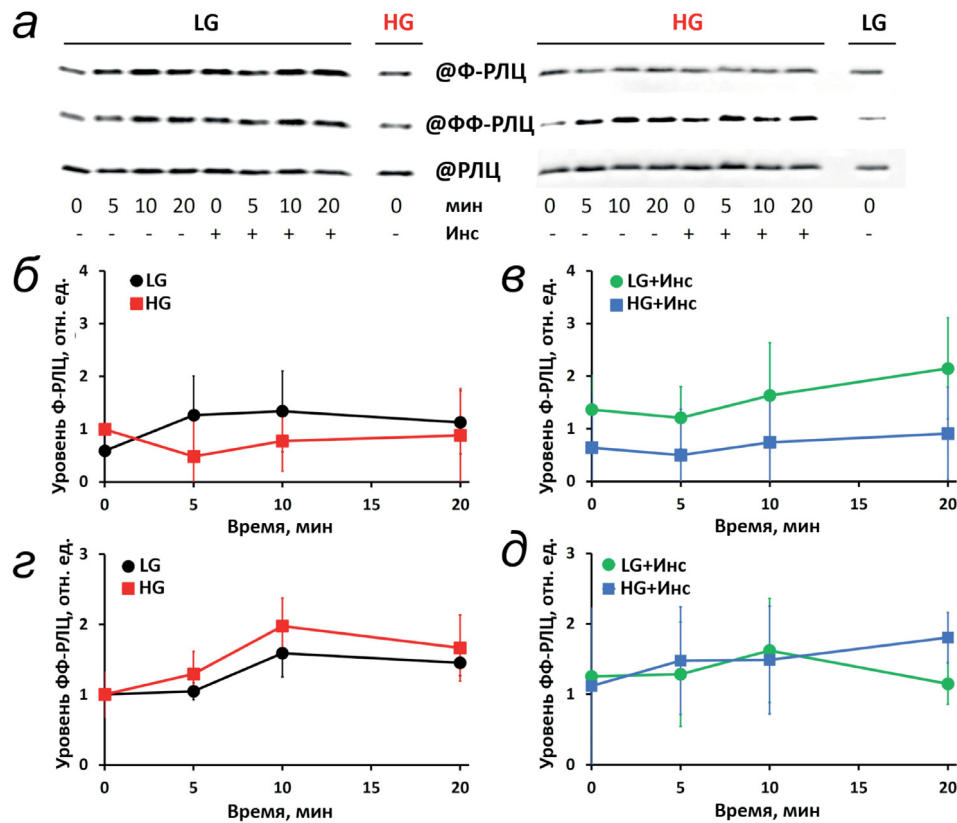


**Рис. 4.** HG и инсулин не влияют на содержание регуляторных белков и гистамин-зависимое фосфорилирование MYR1 в HUVEC. Клетки культивировали в течение 5 дней в присутствии 5 мМ (LG) или 30 мМ (HG) глюкозы и стимулировали 10 мкМ гистамина без или с предварительной стимуляцией 10 нМ инсулина в течение 10 мин (+Инс). *a–d* – Содержание белка анализировали с помощью вестерн-блоттинга в лизатах клеток, культивированных в условиях LG (черные столбцы) или HG (красные столбцы). Полученные значения нормализовали относительно винкулина (для eNOS, ROCK1/2) или ГАФД (для MYR1, РЛЦ), а затем – относительно содержания соответствующего белка в контрольных клетках (условия LG). Под каждым столбцом указано число независимых измерений, типичные изображения мембран иммуноблота показаны над соответствующими столбцами. *e–z* – Динамика фосфорилирования белков в ответ на добавление гистамина в момент времени 0 мин. Все значения нормализованы относительно базового уровня фосфорилирования Ser695 (*e*), Thr696 (*ж*) или Thr853 (*з*) в условиях LG без добавки инсулина. Все данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам по крайней мере двух независимых экспериментов, каждый из которых был проведен в трех повторах

Мы обнаружили, что через 5 дней пребывания HUVEC в условиях HG содержание обеих изоформ ROCK (ROCK1 и ROCK2), eNOS, MYR1 и РЛЦ в клетках не изменилось (рис. 4, *a–d*). Далее, мы проверили влияние HG на гистамин-зависимое фосфорилирование РЛЦ и MYR1 до или после предварительной стимуляции клеток инсулином. Фосфорилирование MYR1 по сайтам, регулирующим фосфатазную активность (Ser695, Thr696 и Thr853), было одинаковым на базовом уровне и незначительно изменялось после стимуляции HUVEC гистамином как в условиях LG, так и HG. Предварительная стимуляция инсулином вызывала умеренное, но незначительное повышение уровней фос-

форилирования Ser695 и Thr696 (рис. 4, *e* и *ж*) и не изменяла уровень фосфорилирования Thr853 (рис. 4, *з*).

Экспериментальная гипергликемия не оказывала существенного влияния ни на базовый, ни на стимулированный гистамином уровень фосфорилирования РЛЦ (рис. 5). Поскольку динамика монофосфорилирования РЛЦ (Ф-РЛЦ) (рис. 5, *б* и *в*) в основном отражает активность  $Ca^{2+}$ -зависимой MLCK [32], фактическое отсутствие реакции фосфорилирования в минутном диапазоне согласуется с быстрыми изменениями  $[Ca^{2+}]_{in}$  в секундном диапазоне ( $\sim 30$  с) в ответ на гистамин (рис. 3). Хотя просматривается тенденция к снижению уровня Ф-РЛЦ в клетках,



**Рис. 5.** HG и инсулин не влияют на индуцированное гистамином фосфорилирование РЛЦ в HUVEC. Клетки подвергали стимуляции, как описано на рис. 4, и анализировали с помощью вестерн-блоттинга на монофосфорилирование (Ф-РЛЦ), дифосфорилирование (ФФ-РЛЦ) и содержание регуляторных легких цепей миозина (РЛЦ). Окрашивание мембран проводили последовательно после стрипирования предыдущих антител. *а* – Типичные изображения мембран, показывающие динамику монофосфорилирования РЛЦ по Ser19 (Ф-РЛЦ, верхние панели), дифосфорилирования РЛЦ по Ser19/Thr18 (ФФ-РЛЦ, средние панели) и содержания РЛЦ (нижние панели) в клетках, культивируемых в условиях LG или HG, как указано. *б–д* – Графики, отражающие динамику Ф-РЛЦ (*б* и *в*) или ФФ-РЛЦ (*г* и *д*) в клетках без (*б* и *г*) и после (*в* и *д*) предварительной стимуляции 10 нМ инсулина. Данные представлены как нормализованные средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам по крайней мере четырех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в двух повторах

культивируемых в HG и предварительно стимулированных инсулином, это различие не было статистически значимым (рис. 5, *в*). Динамика дифосфорилирования РЛЦ (ФФ-РЛЦ) показала ~2-кратное увеличение через 10 мин после стимуляции гистамином (рис. 5, *г*), но ни HG, ни присутствие инсулина на изменения не влияли (рис. 5, *д*). Увеличение уровня ФФ-РЛЦ может отражать активацию RhoA гистамином [28], что согласуется с основным вкладом ROCK в дифосфорилирование РЛЦ [32].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы обнаружили, что целостность и внешний вид монослоя HUVEC не изменяются при длительном воздействии HG на клетки. Это позволяет предположить, что нормальные функции клеток также сохраняются, что хорошо согласуется с сохранением барьерных свойств монослоя HUVEC. За исключением тенденции

к увеличению маркеров апоптоза через 5 дней в HG, ни повышения накопления АФК, ни изменения скорости продукции NO не наблюдалось. Экспериментальная гиперинсулинемия не влияла на эндотелиальный барьер как в HG, так и в LG. Эти результаты находятся в кажущемся противоречии со многими сообщениями о том, что HG быстро повышает продукцию АФК и NO в HUVEC и других эндотелиальных клетках, вызывая окислительный стресс и апоптоз (см. обзор [15] и ссылки в нем). При этом различия в апоптозе между клетками, культивируемыми в HG и LG, были статистически достоверными, но небольшими, оставаясь в пределах нескольких процентов (2–10% при измерении разными методами): 3,5% [49], 10% [50], 5% [51], 6–8% [52], 5% [53], 2,5% [7] и 2% даже после длительного воздействия HG на HUVEC в течение 2 недель [21]. В целом, полученные нами значения находятся в том же диапазоне. Воспалительная реакция, о которой можно судить по экспозиции ICAM-1,

не развивалась. Усиление апоптотической реакции клеток на НГ (по результатам двойного окрашивания аннексином V и йодидом пропидия) было достоверным, но также оставалось в пределах нескольких процентов. Более того, истинный маркер апоптоза, активированная каспаза-3, показывал лишь тенденцию к повышению без статистически достоверных различий. Эти результаты свидетельствуют, что если НГ и усиливает апоптоз, то его доля от общей популяции клеток низка и постоянна, а целостность эндотелиального монослоя поддерживается за счет пролиферации и распластывания соседних клеток. Этот феномен не мог быть замечен в предыдущих работах, поскольку в них использовались краткосрочные протоколы воздействия НГ. С этим выводом согласуется отсутствие существенных изменений эндотелиального барьера HUVEC в условиях НГ (рис. 2). Вопрос о том, могут ли колебания НГ [20, 21] снижать устойчивость клеток и давать качественно иной результат, представляется важным и требует повторного исследования.

Отсутствие повреждающих эффектов НГ на HUVEC дополнительно подтверждается отсутствием различий в реакциях эндотелиального барьера на стрессовые воздействия, в межклеточных контактах и актиновом цитоскелете. В частности, НГ не изменяла реакции TER в ответ на гистамин,  $\alpha$ -тромбин или инсулин. Известно, что ответы на гистамин слабые и зависят от ионов  $Ca^{2+}$  [27, 29]. Ни инсулин, ни НГ не влияли на повышение  $[Ca^{2+}]_{in}$ , вызванное гистамином. Тем не менее остается возможным, что НГ может влиять на отсроченные реакции эндотелия на стимулы, задействующие  $Ca^{2+}$ -независимые механизмы в дополнение к классическим  $Ca^{2+}$ -зависимым.

Индукцированное гистамином фосфорилирование белков цитоскелета согласуется с реакцией эндотелиального барьера на этот агонист. Сократимость цитоскелета, регулируемая  $Ca^{2+}$ -зависимыми и независимыми механизмами, обеспечивает тонкую настройку реакций эндотелиального барьера на внешние сигналы [28, 29]. Она зависит от фосфорилирования РЛЦ миозина [26], регулируемого киназами РЛЦ и фосфатазой [30, 34–37]. Ни содержание этих ключевых регуляторов, ни их фосфорилирование, ни фосфорилирование самих РЛЦ в ответ на гистамин существенно не изменялись под действием НГ. Возможность того, что эти пути могут активироваться инсулином и изменять реакции на гистамин, скорее всего, можно исключить, поскольку предварительная стимуляция клеток инсулином практически не влияла на реакцию TER. Стимуляция инсу-

лином показала только тенденцию к увеличению фосфорилирования MYPT1 по остаткам Ser695 и Thr696. Если для Ser695 известно, что его фосфорилирование опосредовано eNOS и cGMP-зависимой протеинкиназой [54], то за фосфорилирование Thr696, скорее всего, отвечает ROCK, активируемая RhoA [28]. Однако фосфорилирование этих остатков оказывает противоположное воздействие на активность фосфатазы [54], что согласуется с отсутствием изменений общего уровня фосфорилирования РЛЦ.

В целом, наши результаты указывают, что сосудистый эндотелий устойчив к длительному воздействию НГ. Отсутствие ранних ответов на НГ в виде повышения уровня АФК и изменения продукции NO, которые часто наблюдались в предыдущих исследованиях, моделирующих гипергликемию *in vitro* [15], не означает, что они не могут развиваться на более поздних стадиях СД2. Вполне вероятно, что повреждающие эффекты гипергликемии у больных СД2 развиваются на фоне дислипидемии, которая обычно предшествует гипергликемии. Полученные нами ранее данные подтверждают это предположение [42]. Кроме хорошо известного окислительного стресса [8–10], эффекты НГ, вероятно, включают гликирование и гликозилирование белков [55, 56]. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования для выяснения молекулярных механизмов сосудистых повреждений при развитии СД2.

**Вклад авторов.** Концептуализация и методология — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников, В.П. Ширинский; проведение исследований — А.Ю. Хапчаев, О.А. Антонова, М.В. Самсонов, О.А. Казакова, А.В. Воротников; обработка полученных результатов — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников; написание манускрипта — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников; руководство — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников, В.П. Ширинский; получение финансирования — А.Ю. Хапчаев, В.П. Ширинский.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 19-15-00361) в части экспериментов по жизнеспособности HUVEC и долгосрочных экспериментов ECIS и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00565) в проведении других экспериментах.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications, *Diabetes Care*, **19**, 257-267, doi: 10.2337/diacare.19.3.257.
2. Goligorsky, M. S. (2017) Vascular endothelium in diabetes, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **312**, F266-F275, doi: 10.1152/ajprenal.00473.2016.
3. Bakker, W., Eringa, E. C., Sipkema, P., and van Hinsbergh, V. W. (2009) Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity, *Cell Tissue Res.*, **335**, 165-189, doi: 10.1007/s00441-008-0685-6.
4. Del Turco, S., Gaggini, M., Daniele, G., Basta, G., Folli, F., Sicari, R., and Gastaldelli, A. (2013) Insulin resistance and endothelial dysfunction: a mutual relationship in cardiometabolic risk, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 2420-2431, doi: 10.2174/1381612811319130010.
5. Jansson, P. A. (2007) Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes, *J. Intern. Med.*, **262**, 173-183, doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01830.x.
6. Knapp, M., Tu, X., and Wu, R. (2019) Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy, *Acta Pharmacol. Sin.*, **40**, 1-8, doi: 10.1038/s41401-018-0042-6.
7. Varma, S., Lal, B. K., Zheng, R., Breslin, J. W., Saito, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W., 2nd, and Durán, W. N. (2005) Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H1744-H1751, doi: 10.1152/ajpheart.01088.2004.
8. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocr. Rev.*, **23**, 599-622, doi: 10.1210/er.2001-0039.
9. Green, K., Brand, M. D., and Murphy, M. P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes*, **53**, S110-S118, doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s110.
10. Shah, M. S., Brownlee, M. (2016) Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes, *Circ. Res.*, **118**, 1808-1829, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306923.
11. Jiménez, N., Krouwer, V. J., and Post, J. A. (2013) A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium *in vitro*, *Cytotechnology*, **65**, 1-14, doi: 10.1007/s10616-012-9459-9.
12. Navone, S. E., Marfia, G., Invernici, G., Cristini, S., Nava, S., Balbi, S., Sangiorgi, S., Ciusani, E., Bosutti, A., Alessandri, G., Slevin, M., and Parati, E. A. (2013) Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells, *Nat. Protoc.*, **8**, 1680-1693, doi: 10.1038/nprot.2013.107.
13. Hauser, S., Jung, F., and Pietzsch, J. (2017) Human endothelial cell models in biomaterial research, *Trends Biotechnol.*, **35**, 265-277, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
14. Medina-Leyte, D. J., Domínguez-Pérez, M., Mercado, I., Villarreal-Molina, M. T., and Jacobo-Albavera, L. (2020) Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: a review, *Appl. Sci.*, **10**, 938, doi: 10.3390/app10030938.
15. Vorotnikov, A. V., Khapchaev, A. Yu., Nickashin, A. V., and Shirinsky, V. P. (2022) *In vitro* modeling of diabetes impact on vascular endothelium: Are essentials engaged to tune metabolism? *Biomedicines*, **10**, 3181, doi: 10.3390/biomedicines10123181.
16. Van den Oever, I. A., Raterman, H. G., Nurmohamed, M. T., and Simsek, S. (2010) Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus, *Mediators Inflamm.*, **2010**, 792393, doi: 10.1155/2010/792393.
17. Gill, S. E., Rohan, M., and Mehta, S. (2015) Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury *in vivo*, *Respir. Res.*, **16**, 109, doi: 10.1186/s12931-015-0266-7.
18. Mallat, Z., and Tedgui, A. (2000) Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance, *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 947-962, doi: 10.1038/sj.bjp.0703407.
19. Winn, R. K., and Harlan, J. M. (2005) The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1815-1824, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x.
20. Quagliari, L., Piconi, L., Assaloni, R., Martinelli, L., Motz, E., and Ceriello, A. (2003) Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation, *Diabetes*, **52**, 2795-2804, doi: 10.2337/diabetes.52.11.2795.
21. Risso, A., Mercuri, F., Quagliari, L., Damante, G., and Ceriello, A. (2001) Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **281**, E924-E930, doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.5.E924.
22. Komarova, Y., and Malik, A. B. (2010) Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways, *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 463-493, doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135833.
23. Cahill, P. A., and Redmond, E. M. (2016) Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health, *Atherosclerosis*, **248**, 97-109, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
24. Di, A., Mehta, D., and Malik, A. B. (2016) ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function, *Cell Calcium*, **60**, 163-171, doi: 10.1016/j.ceca.2016.02.002.
25. Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013) The vascular endothelium and human diseases, *Int. J. Biol. Sci.*, **9**, 1057-1069, doi: 10.7150/ijbs.7502.

26. Goeckeler, Z. M., Bridgman, P. C., and Wysolmerski, R. B. (2008) Nonmuscle myosin II is responsible for maintaining endothelial cell basal tone and stress fiber integrity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295**, C994-C1006, doi: 10.1152/ajpcell.00318.2008.
27. Dalal, P. J., Muller, W. A., and Sullivan, D. P. (2020) Endothelial cell calcium signaling during barrier function and inflammation, *Am. J. Pathol.*, **190**, 535-542, doi: 10.1016/j.ajpath.2019.11.004.
28. Kugelmann, D., Rotkopf, L. T., Radeva, M. Y., Garcia-Ponce, A., Walter, E., and Waschke, J. (2018) Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca<sup>2+</sup>-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions, *Sci. Rep.*, **8**, 13229, doi: 10.1038/s41598-018-31408-3.
29. Van Nieuw Amerongen, G. P., Draijer, R., Vermeer, M. A., and van Hinsbergh, V. W. (1998) Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA, *Circ. Res.*, **83**, 1115-1123, doi: 10.1161/01.res.83.11.1115.
30. Khapchaev, A. Y., and Shirinsky, V. P. (2016) Myosin light chain kinase MYLK1: anatomy, interactions, functions, and regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1676-1697, doi: 10.1134/S000629791613006X.
31. Shimokawa, H., Sunamura, S., and Satoh, K. (2016) RhoA/Rho-kinase in the cardiovascular system, *Circ. Res.*, **118**, 352-366, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.
32. Kazakova, O. A., Khapchaev, A. Y., and Shirinsky, V. P. (2020) MLCK and ROCK mutualism in endothelial barrier dysfunction, *Biochimie*, **168**, 83-91, doi: 10.1016/j.biochi.2019.10.010.
33. Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., and Hartshorne, D. J. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function, *Mol. Cell. Biochem.*, **259**, 197-209, doi: 10.1023/b:mcbi.0000021373.14288.00.
34. Kim, K. M., Csontos, C., Czikora, I., Fulton, D., Umapathy, N. S., Olah, G., and Verin, A. D. (2012) Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium, *J. Cell. Physiol.*, **227**, 1701-1708, doi: 10.1002/jcp.22894.
35. Beckers, C. M., Knezevic, N., Valent, E. T., Tauseef, M., Krishnan, R., Rajendran, K., Hardin, C. C., Aman, J., van Bezu, J., Sweetnam, P., van Hinsbergh, V. W., Mehta, D., and van Nieuw Amerongen, G. P. (2015) ROCK2 primes the endothelium for vascular hyperpermeability responses by raising baseline junctional tension, *Vascul. Pharmacol.*, **70**, 45-54, doi: 10.1016/j.vph.2015.03.017.
36. Birukova, A. A., Smurova, K., Birukov, K. G., Kaibuchi, K., Garcia, J. G., and Verin, A. D. (2004) Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction, *Microvasc. Res.*, **67**, 64-77, doi: 10.1016/j.mvr.2003.09.007.
37. Wainwright, M. S., Rossi, J., Schavocky, J., Crawford, S., Steinhorn, D., Velentza, A. V., Zasadzki, M., Shirinsky, V., Jia, Y., Haiech, J., Van Eldik, L. J., and Watterson, D. M. (2003) Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and *in vivo* inhibitor treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6233-6238, doi: 10.1073/pnas.1031595100.
38. Langouche, L., Vanhorebeek, I., Vlasselaers, D., Vander Perre, S., Wouters, P. J., Skogstrand, K., Hansen, T. K., and Van den Berghe, G. (2005) Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients, *J. Clin. Invest.*, **115**, 2277-2286, doi: 10.1172/JCI25385.
39. Nathan, D. M., Cleary, P. A., Backlund, J. Y., Genuth, S. M., Lachin, J. M., Orchard, T. J., Raskin, P., Zinman, B., and Diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study research group (2005) Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 2643-2653, doi: 10.1056/NEJMoa052187.
40. Gunduz, D., Thom, J., Hussain, I., Lopez, D., Hartel, F. V., Erdogan, A., Grebe, M., Sedding, D., Piper, H. M., Tillmanns, H., Noll, T., and Aslam, M. (2010) Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-mediated Rac1 activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 1237-1245, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.203901.
41. Samsonov, M. V., Podkuychenko, N. V., Lankin, V. Z., Vorotnikov, A. V., and Shirinsky, V. P. (2021) Malondialdehyde but not methylglyoxal impairs insulin signaling, NO production, and endothelial barrier, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series A Memb. Cell Biol.*, **15**, 195-200, doi: 10.1134/S1990747821030089.
42. Samsonov, M. V., Podkuychenko, N. V., Khapchaev, A. Y., Efremov, E. E., Yanushevskaya, E. V., Vlasik, T. N., Lankin, V. Z., Stafeev, I. S., Skulachev, M. V., Shestakova, M. V., Vorotnikov, A. V., and Shirinsky, V. P. (2022) AICAR protects vascular endothelial cells from oxidative injury induced by the long-term palmitate excess, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 211, doi: 10.3390/ijms23010211.
43. Printseva, O., Pecló, M. M., and Gown, A. M. (1992) Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3, *Am. J. Pathol.*, **140**, 889-896.
44. Segawa, K., and Nagata, S. (2015) An apoptotic "eat me" signal: phosphatidylserine exposure, *Trends Cell Biol.*, **25**, 639-650, doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.003.
45. Bui, T. M., Wiesolek, H. L., and Sumagin, R. (2020) ICAM-1: a master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis, *J. Leukoc. Biol.*, **108**, 787-799, doi: 10.1002/JLB.2MR0220-549R.
46. Porter, A. G., and Janicke, R. U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ.*, **6**, 99-104, doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.

47. Antonova, O. A., Loktionova, S. A., Romanov, Y. A., Shustova, O. N., Khachikian, M. V., and Mazurov, A. V. (2009) Activation and damage of endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. Effect of extracellular pH, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 605-612, doi: 10.1134/S0006297909060030.
48. Kazakova, O. A., Khapchaev, A. Y., Ragimov, A. A., Salimov, E. L., and Shirinsky, V. P. (2019) Western blotting-based quantitative measurement of myosin II regulatory light chain phosphorylation in small amounts of non-muscle cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 11-19, doi: 10.1134/S0006297919010024.
49. Baumgartner-Parzer, S. M., Wagner, L., Pettermann, M., Grillari, J., Gessl, A., and Waldhausl, W. (1995) High-glucose – triggered apoptosis in cultured endothelial cells, *Diabetes*, **44**, 1323-1327, doi: 10.2337/diab.44.11.1323.
50. Fan, W., Han, D., Sun, Z., Ma, S., Gao, L., Chen, J., Li, X., Li, X., Fan, M., Li, C., Huc, D., Wanga, Y., and Cao, F. (2017) Endothelial deletion of mTORC1 protects against hindlimb ischemia in diabetic mice via activation of autophagy, attenuation of oxidative stress and alleviation of inflammation, *Free Radic. Biol. Med.*, **108**, 725-740, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.001.
51. Ido, Y., Carling, D., and Ruderman, N. (2002) Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation, *Diabetes*, **51**, 159-167, doi: 10.2337/diabetes.51.1.159.
52. Sheu, M. L., Ho, F. M., Yang, R. S., Chao, K. F., Lin, W. W., Lin-Shiau, S. Y., and Liu, S. H. (2005) High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 539-545, doi: 10.1161/01.ATV.0000155462.24263.e4.
53. Pal, P. B., Sonowal, H., Shukla, K., Srivastava, S. K., and Ramana, K. V. (2019) Aldose reductase regulates hyperglycemia-induced HUVEC death via SIRT1/AMPK- $\alpha$ 1/mTOR pathway, *J. Mol. Endocrinol.*, **63**, 11-25, doi: 10.1530/JME-19-0080.
54. Kiss, A., Erdődi, F., and Lontay, B. (2019) Myosin phosphatase: unexpected functions of a long-known enzyme, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1866**, 2-15, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.023.
55. Federici, M., Menghini, R., Mauriello, A., Hribal, M. L., Ferrelli, F., Lauro, D., Sbraccia, P., Spagnoli, L. G., Sesti, G., and Lauro, R. (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells, *Circulation*, **106**, 466-472, doi: 10.1161/01.cir.0000023043.02648.51.
56. Lenin, R., Nagy, P. G., Jha, K. A., and Gangaraju, R. (2019) GRP78 translocation to the cell surface and O-GlcNAcylation of VE-Cadherin contribute to ER stress-mediated endothelial permeability, *Sci. Rep.*, **9**, 10783, doi: 10.1038/s41598-019-47246-w.

## LONG-TERM EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA DOES NOT IMPAIR MACROVASCULAR ENDOTHELIAL BARRIER INTEGRITY AND FUNCTION *in vitro*

A. Y. Khapchaev\*, O. A. Antonova, O. A. Kazakova, M. V. Samsonov, A. V. Vorotnikov, and V. P. Shirinsky

*Institute of Experimental Cardiology, E. I. Chazov National Medical Research Center for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; e-mail: AYKhapchaev@cardio.ru*

Hyperglycemia is a hallmark of type 2 diabetes implicated in vascular endothelial dysfunction and cardiovascular complications. Many *in vitro* studies identified endothelial apoptosis as an early outcome of experimentally modeled hyperglycemia emphasizing cell demise as a significant factor of vascular injury. However, endothelial apoptosis has not been observed *in vivo* until the late stages of type 2 diabetes. Here, we studied the long-term (up to 4 weeks) effects of high glucose (HG, 30 mM) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. HG did not alter HUVEC monolayer morphology, ROS levels, NO production, and exerted minor effects on the HUVEC apoptosis markers. The barrier responses to various clues were indistinguishable from those by cells cultured in physiological glucose (5 mM). Tackling the key regulators of cytoskeletal contractility and endothelial barrier revealed no differences in the histamine-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> responses, nor in phosphorylation of myosin regulatory light chain or myosin light chain phosphatase. Altogether, these findings suggest that vascular endothelial cells may well tolerate HG for relatively long exposures and warrant further studies to explore mechanisms involved in vascular damage in advanced type 2 diabetes.

**Keywords:** HUVEC, endothelial barrier, hyperglycemia, insulin, ROS, NO, myosin RLC, MYPT1