

Роль эндотелиального гликокаликса в механогенной регуляции тонуса артериальных сосудов

И.В. Гончар^{1,2}, И.А. Валиев¹, О.А. Антонова², А.М. Мелькумянц^{1,2}

¹Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, г. Москва

Введение

Диаметр артериальных сосудов изменяется при изменениях расхода протекающей по ним крови. Эта регуляция гидравлического сопротивления артерий, обеспечивающая адекватное активности кровоснабжение органов и тканей, реализуется благодаря способности клеток эндотелия выделять расслабляющие гладкие мышцы вещества, основным среди которых является оксид азота (NO), в ответ на повышение сдвигового напряжения на стенке сосуда [1]. Долгое время полагали, что рецептором механического напряжения является кортикальный слой эндотелиоцитов. Однако недавние исследования дали основания полагать, что первичным механорецептором являются не сами по себе эндотелиоциты, а волокна эндотелиального гликокаликса, который является внеклеточным матриксом клеток эндотелия.

Гликокаликс представляет собой упорядоченную структуру, состоящую из различных биополимеров, большую часть которых составляют гликопротеины, гликозаминогликаны и протеогликаны. Основными среди них являются гиалуронан (главный структурный компонент), гепарансульфат, хондроитинсульфат, синдеканы и глипиканы [2]. Эти разветвлённые, выступающие в просвет сосуда на расстояние до 10 мкм соединения, деформируясь под действием напряжения сдвига, вызывают деформации волокон альфа-актина в корковом слое эндотелиальных клеток, запуская тем самым синтез вазоактивных веществ [3,4].

Цели настоящей работы состояли в том, чтобы:

1. в опытах на магистральных артериях млекопитающих доказать, что именно волокна гликокаликса обеспечивают механочувствительность артериального эндотелия;
2. показать, что благодаря механочувствительности гликокаликса происходит ориентация эндотелиальных клеток параллельно линиям тока крови.

Методика экспериментов

Эксперименты на перфузируемых in vitro магистральных артериях кролика.

Для подтверждения роли гликокаликса в механогенной регуляции тонуса сосудов были проведены эксперименты на сонной и бедренной артериях анестезированных кроликов ($n=8$). Использовались самцы массой $3,6\pm 0,3$ кг, которым для достижения III стадии наркоза струйно через краевую вену уха вводили 10 % раствор уретана ($1,5$ мг/кг). После этого рассекали ткани над исследуемой артерией, очищали её от фасций и прилегающих тканей на длине $4,5\pm 0,5$ мм, отходящие от неё ветви перевязывали и перерезали. Затем очищенный отрезок артерии канюлировали с обеих сторон, канюли фиксировали специальным фиксатором, настроенным на прижизненную длину выделенного сегмента, извлекали этот сегмент из тканей и переносили в термостатируемую перфузионную кювету, где присоединяли к трубкам перфузионной системы.

Установка для перфузии состоит из перистальтического насоса, теплообменника и подогреваемой кюветы, температура в которой поддерживается на уровне $37,0\pm 0,5$ °С, электромагнитного расходомера, манометра и системы стабилизации давления, которая позволяет за счёт обратной связи поддерживать давление в исследуемом сегменте сосуда неизменным ($p = 100$ Торр) при изменениях расхода в широких пределах (от 2 до 30 мл/мин). Сосуд перфузировали раствором Кребса–Хенселейта с добавлением в него 8 % высокомолекулярного декстрана (для повышения вязкости) и крови кролика (в соотношении 5:1). Диаметр средней части сегмента артерии измеряли контактным емкостным датчиком перемещений.

В контрольном периоде опыта регистрировали изменение диаметра артерии при изменении потока раствора через него или при добавлении в кювету с артерией, заполненную раствором Рингера, ацетилхолина в концентрации 10^{-7} – 10^{-6} М. Величины изменения потока перфузата и концентрации ацетилхолина подбирали таким образом, чтобы они вызывали одинаковое изменение диаметра сегмента артерии. Сигналы диаметра, кровотока и давления записывали в память ПК и выводили на его монитор в режиме реального времени.

После окончания контрольного периода (регистрации реакций на сосуде с интактным гликокаликсом) в перфузионный раствор добавляли один из ферментов, повреждающий гликокаликс,

а именно, гиалуронидазу (2,5 мМ, время экспозиции 2 ч) или гепариназу III (0,25 мМ, 2 ч). Затем производили те же измерения с изменяющимся потоком и воздействием ацетилхолина, что и в контроле.

Эксперименты на культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека

Изучение способности эндотелиоцитов ориентироваться по потоку проводили на культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Клетки выделяли из вены, очищали и выращивали на пластиковых стёклах до получения конфлуэнтного монослоя. В работе использовали клетки 2–3 пассажей. Перед перфузией на фазово-контрастном микроскопе (Nikon) исследовали ориентацию эндотелиоцитов: для каждой клетки определяли направление её наибольшего поперечного размера и измеряли угол между ним и осью симметрии стекла, т. е. направлением течения перфузата. Затем стёкла помещали в термостатированные при $37,0 \pm 0,1$ °С перфузионные камеры, которые создавали на эндотелиоцитах напряжение сдвига порядка 20 дин/см². В опытах использовали две одинаковые перфузионные камеры: контрольную, в которой клетки перфузировали культуральной средой DMEM, и камеру, в которой перфузионная среда содержала один из повреждающих гликокаликс ферментов — либо гиалуронидазу (2,5 мМ), либо гепариназу III (0,25 мМ). Перфузия осуществлялась в течение 24 ч, после чего снова измеряли ориентацию клеток эндотелия на стёклах из обеих камер.

Результаты работы

1. Эксперименты на крупных артериях кроликов показали, что на ацетилхолин (10^{-7} – 10^{-6} М, 60 с) эти сосуды реагируют практически одинаковым расширением вне зависимости от того, сохранен ли гликокаликс или он поврежден (рис. 1). Однако сосуды с ферментативно повреждённым гликокаликсом демонстрировали значительно меньшее, чем в контроле, расширение в ответ на трехкратное увеличение потока. Увеличение диаметра таких артерий составляло $13,2 \pm 10,8$ % от такового, регистрировавшегося в артериях с интактным гликокаликсом, в то время как величина ответа на ацетилхолин уменьшалась недостоверно ($p > 0,1$).

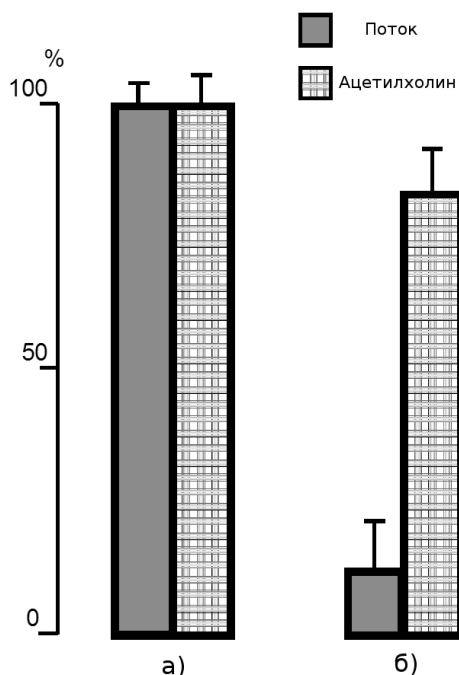


Рис. 1. Влияние повреждения гликокаликса на расширение сонной артерии кролика, вызванное увеличением расхода раствора и ацетилхолином. Слева — артерии с интактным гликокаликсом, справа — артерии после инкубации в течение двух часов с 0,25 мМ гепариназы III.

2. После 24-часовой перфузии эндотелиоцитов наблюдалось (при фазово-контрастной микроскопии) возникновение ориентации параллельно линиям тока раствора лишь у клеток с интактным гликокаликсом: они были вытянуты вдоль оси перфузионной камеры и имели форму эллипсов. Большинство клеток после перфузии в интактном состоянии отклонялось не более, чем на 30° от направления течения перфузата (рис. 2). Клетки, обработанные ферментами, после 24 ч перфузии сохранили неправильную форму без какой-либо определённой ориентации, как и до приложения сдвигового напряжения (рис. 3).

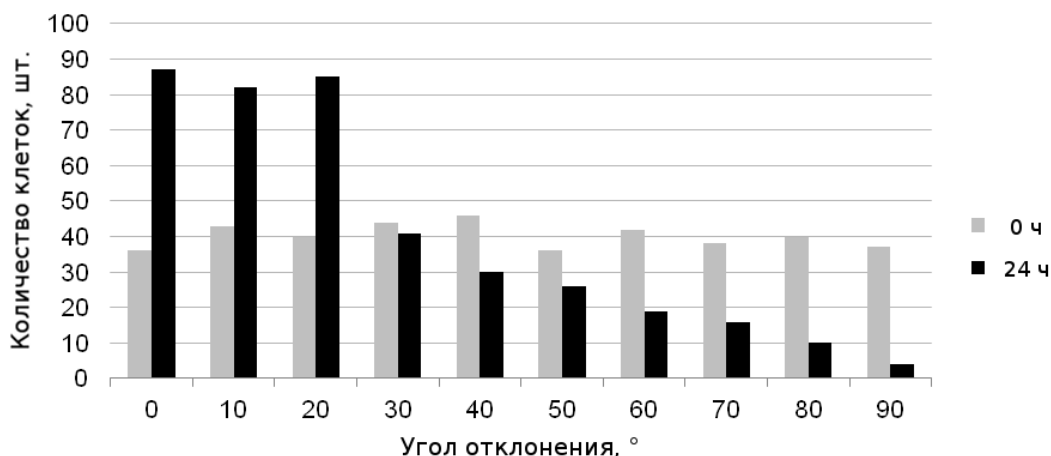


Рис. 2. Ориентация клеток (HUVEC) с интактным гликокаликсом до (светлые столбики) и после (темные столбики) 24-часового воздействия напряжения сдвига (20 дин/см²).

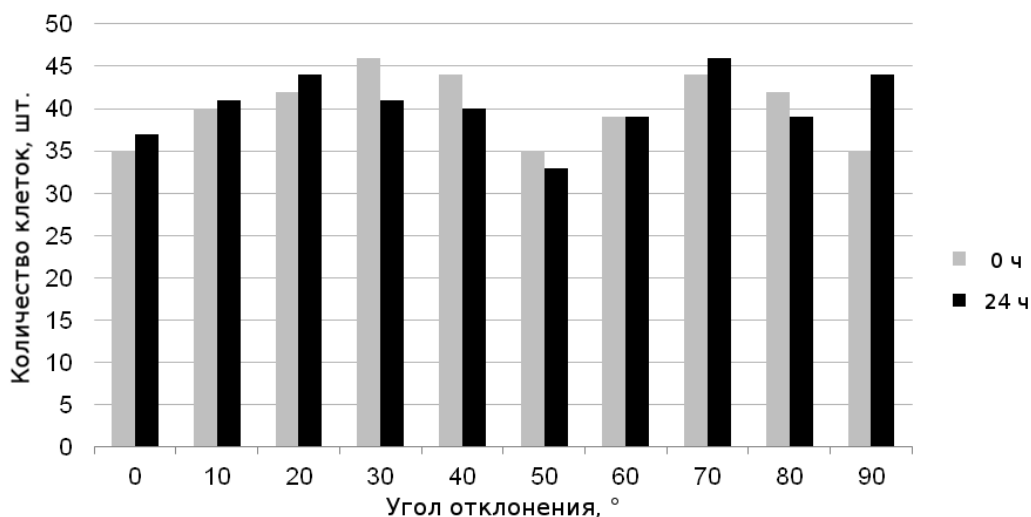


Рис. 3. Ориентация клеток (HUVEC) с ферментативно поврежденным гликокаликсом до и после 24-часового воздействия напряжения сдвига (20 дин/см²).

Обсуждение результатов

1. Данные, полученные в экспериментах на перфузируемых *in vitro* артериях показывают, во-первых, что избирательное повреждение гликокаликса не влияет на сам процесс выделения эндотелиоцитами вазоактивных веществ, поскольку не наблюдается значимого изменения величины ответа на ацетилхолин, который вызывает выделение вазодилатора NO. Во-вторых, результаты экспериментов подтверждают, что эндотелиальные клетки способны реагировать изменением диаметра на увеличение напряжения сдвига только при сохранении интактного гликокаликса, поскольку при его повреждении способность сосуда регулировать свой диаметр соответственно напряжению сдвига практически утрачивается. Таким образом, проведенные эксперименты позволяют утверждать, что именно гликокаликс является ключевым звеном обусловленной эндотелием механогенной регуляции сосудистого тонуса.

2. Результаты исследования ориентации клеток эндотелия в культуре при воздействии напряжения сдвига показывают, что клетки с интактным гликокаликсом значительно меняют свою ориентацию и выстраиваются параллельно потоку жидкости в камере, в то время как клетки с поврежденным гликокаликсом не ориентируются в сдвиговом потоке жидкости. Эти данные свидетельствуют о том, что эндотелиоциты способны реагировать изменением своей формы и ориентации только при наличии неповрежденного гликокаликса.

Суммируя, можно заключить, что опосредуемая эндотелием механогенная регуляция гидравлического сопротивления артериальных сосудов реализуется только в сосудах с интактным

гликокаликсом, который является первичным механорецептором эндотелиальных клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-04-01119).

Литература

1. Мелькумянц А.М., Балашов С.А. Механочувствительность артериального эндотелия. — М.:Триада, 2005.
2. Collins S.R. [et al.] The endothelial glycocalyx: Emerging concepts in pulmonary edema and acute lung injury. // Anesthesia and Analgesia. 2013. Vol. 117. N. 3. P. 664–674.
3. Barakat A.I. Dragging along: the glycocalyx and vascular endothelial cell mechanotransduction // Circulation research. 2008. N.102. P. 747–748.
4. Weinbaum S., Tarbell J.M., Damiano E.R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer // Annual review of biomedical engineering. 2007. N.9. P.121–167.

Сведения об авторах

- Гончар И.В. — студент кафедры физики живых систем МФТИ (ГУ), лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной патологии сердца РКНПК МЗ РФ.
- Валиев И.А. — выпускник кафедры физики живых систем МФТИ (ГУ).
- Антонова О.А. — к.б.н., м.н.с. лаборатории клеточной адгезии РКНПК МЗ РФ.
- Мелькумянц А.М. — д.б.н., профессор, в.н.с. лаборатории экспериментальной патологии сердца РКНПК МЗ РФ.