

УДК 57.054:612.13

И. В. Гончар<sup>1,2</sup>, С. А. Балашов<sup>2</sup>, И. А. Валиев<sup>1</sup>, О. А. Антонова<sup>2</sup>,  
А. М. Мелькумянц<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

<sup>2</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ

## Роль эндотелиального гликокаликса в механогенной регуляции тонуса артериальных сосудов

В работе изучается роль эндотелиального гликокаликса в регуляции тонуса артериальных сосудов в соответствии с напряжением сдвига на стенке сосудов. В опытах на перфузируемых *in vitro* общей сонной и бедренной артериях кроликов показано, что ферментативное повреждение гликокаликса гиалуронидазой или гепариназой значительно подавляет или полностью устраняет дилататорные ответы этих сосудов на повышение скорости течения в них перфузионного раствора при сохраняющейся неизменной эндотелий-зависимой дилатации на ацетилхолин. Кроме того, в опытах на культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека показано, что при повреждении гликокаликса эти клетки полностью утрачивают способность ориентироваться параллельно линиям тока перфузата. В совокупности полученные данные свидетельствуют о ключевой роли эндотелиального гликокаликса в механогенной регуляции сосудистого тонуса.

**Ключевые слова:** эндотелиальный гликокаликс, эндотелий-зависимая вазодилатация, напряжение сдвига, скорость кровотока, механорецепция, регуляция кровообращения.

I. V. Gonchar<sup>1,2</sup>, S. A. Balashov<sup>2</sup>, I. A. Valiev<sup>1</sup>, O. A. Antonova<sup>2</sup>,  
A. M. Melkumyants<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University)

<sup>2</sup>Russian Cardiology Research Center

## Role of endothelial glycocalyx in the mechanogenic regulation of arterial tone

The role of endothelial glycocalyx in the shear-induced control of arterial tone is investigated on common carotid and femoral arteries of anesthetized rabbits. It is shown that glycocalyx disruption using hyaluronidase or heparinase considerably hampers or eliminates the ability of these vessels to dilate in response to the increased flow rate, whereas their response to acetylcholine remains practically the same as in the arteries with intact glycocalyx. Besides, in experiments using the culture of human umbilical vein endothelial cells, we show that the disruption of glycocalyx leads to a complete loss of the cell's ability to orient in parallel to the flow. Both results evidence the key role of endothelial glycocalyx in the shear-induced control of arterial tone.

**Key words:** endothelial glycocalyx, endothelium-dependent vasodilation, flow induced dilation, shear stress, blood flow, mechanoreception, circulatory regulation.

### 1. Введение

Диаметр артериальных сосудов изменяется при изменениях расхода протекающей по ним крови. Такая механогенная регуляция гидравлического сопротивления артерий обеспечивает органы и ткани должным кровоснабжением, отвечающим их активности, без существенных вариаций системного артериального давления. При повышении объёмной скорости кровотока возрастает сдвиговое напряжение на стенке сосуда, обусловленное силами вязкого трения пристеночных слоёв плазмы. В ответ на повышение касательного

напряжения эндотелиальные клетки, выстилающие интиму сосуда, выделяют вазоактивные вещества, которые влияют на тонус гладких мышц меди [1, 2]. Ранее было показано, что основным среди них является оксид азота (NO) — лабильный вазодилататор, образующийся из L-аргинина с помощью NO-синтазы [3, 4]. Этот фермент постоянно активен в эндотелиоцитах, обеспечивая регуляцию тонуса сосудов. Оксид азота выделяется клетками эндотелия как под действием множества фармакологических агентов, среди которых ацетилхолин, гистамин, брадикинин и вещество P, так и под действием механического стимула — напряжения сдвига на стенке сосуда.

Долгое время полагали, что рецептором механического напряжения является кортикальный слой эндотелиоцитов, механическое напряжение с которого передаётся на сеть волокон альфа-актина и через цепь биохимических реакций изменяет активность NO-синтазы. Однако недавние исследования [5–7] 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 [8]. Эти разветвлённые соединения с большим числом отрицательно заряженных групп выступают в просвет сосуда на расстояние до 10 мкм [9]; в клетках эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) толщина гликокаликса составляет 2–3 мкм [10]. На поверхности эндотелиоцитов устанавливается динамическое равновесие, определяющее толщину гликокаликса: достигается баланс между удалением его компонентов с током крови за счёт сдвиговых напряжений над клетками эндотелия и интенсивностью наработки структурных элементов клеточными машинами и прикреплением гликозаминогликанов к мембране эндотелиальных клеток.

Таким образом, гликокаликс является той частью эндотелиоцитов, которая непосредственно контактирует с кровью (плазмой) и подвергается воздействию сдвигового напряжения. Последнее не только регулирует выделение вазоактивных веществ эндотелиоцитами, но и влияет на структуру их цитоскелета. Ранее было показано, что при длительном воздействии напряжения сдвига клетки эндотелия изменяют свою ориентацию и вытягиваются вдоль линий тока крови. При этом возникает перестройка сети волокон альфа-актина, образующих основу цитоскелета эндотелиоцитов [5]. Данные факты позволяют выдвинуть гипотезу, что гликокаликс является первичным рецептором механического стимула — напряжения сдвига. Подтверждению данной гипотезы посвящена настоящая работа. Её цель — в опытах на крупных артериях млекопитающего и культуре эндотелиоцитов человека доказать ключевую роль гликокаликса в обеспечении механочувствительности артериального эндотелия, которая лежит в основе регуляции диаметра сосудов и ориентации клеток эндотелия по линиям тока крови.

## 2. Методика экспериментов

### 2.1. Эксперименты на перфузируемых *in vitro* магистральных артериях кролика

Для подтверждения роли гликокаликса в механогенной регуляции тонуса сосудов были проведены эксперименты на общих сонных и бедренных артериях анестезированных кроликов ( $n = 8$ ). Использовались самцы массой  $3,6 \pm 0,3$  кг. Животных анестезировали, вводя струйно через краевую вену уха 10 % раствор уретана (1,5 мг/кг) и гепарин (100 ед/кг) для предотвращения тромбоза катетера и сосудистых канюль. После наркотизации животное фиксировали на спине, рассекали ткани над исследуемой артерией, очищали её от фасций и прилегающих тканей на длине  $4,5 \pm 0,5$  мм. Отходящие от артерии ветви перевязывали и перерезали. Затем очищенный отрезок артерии канюлировали с обеих сторон, канюли закрепляли в специальном фиксаторе, настроенном на прижизненную длину выделенно-

го сегмента. Далее извлекали этот сегмент из тканей и переносили в термостатируемую перфузионную кювету с раствором Рингера, где канюли присоединяли к трубкам перфузионной системы.

Установка для перфузии (рис. 1) 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 отрицательной обратной связи поддерживать давление в исследуемом сегменте сосуда постоянным ( $p = 100$  мм рт. ст.) при изменениях расхода в широких пределах (от 2 до 30 мл/мин). Диаметр средней части сегмента артерии измеряли контактным емкостным датчиком перемещений. Сегмент артерии перфузировали раствором Кребса—Хенселейта, в который добавляли 8 % высокомолекулярного декстрана (для повышения вязкости) и 3 % альбумина или крови кролика (в соотношении 5:1). Необходимость добавлять в перфузат белок определяется тем, что, как было показано ранее [11,12], при перфузии безбелковым раствором артерии утрачивают способность регулировать свой диаметр при изменениях скорости кровотока.

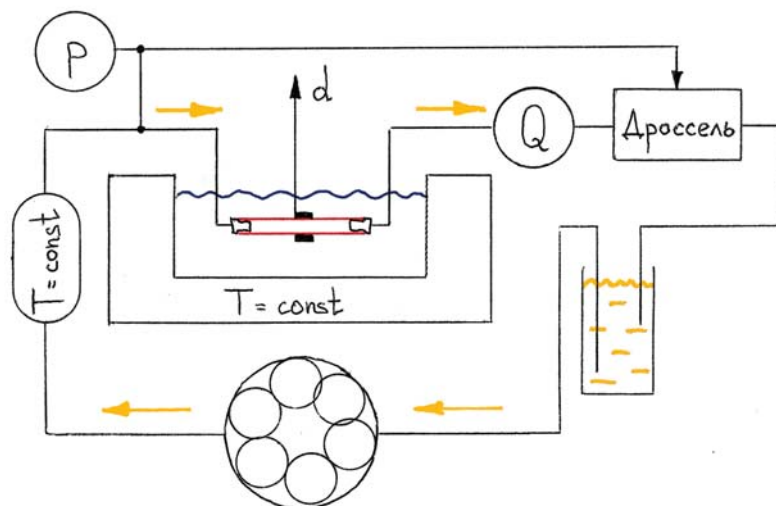


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для изучения роли эндотелиального гликокаликса в механогенной регуляции сосудистого тонуса.

Перфузионный раствор с помощью перистальтического насоса (Rainin) прокачивается через теплообменник, после чего поступает в выделенный сегмент артерии. Сегмент артерии, зафиксированный специальным фиксатором на входной и выходной канюлях, погружен в термостатированный раствор Рингера; длина сегмента равна его прижизненной длине. Диаметр артерии измеряли с помощью контактного емкостного датчика перемещений [13]. Давление перед сегментом артерии стабилизировали с помощью электромагнитного дросселя, управляемого сигналом манометра в петле отрицательной обратной связи [14]. Расход раствора, протекающего через исследуемый сегмент сосуда, измеряли с помощью электромагнитного расходомера крови (Biotronex)

Сначала проводили контрольные измерения с интактным гликокаликсом сосудистого эндотелия: регистрировали изменения диаметра артерии, вызванные изменениями расхода перфузионного раствора с 3–4 до 20–22 мл/мин и при добавлении в кювету с артерией ацетилхолина в концентрации  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М. Ацетилхолин индуцирует выделение NO эндотелиальными клетками, поэтому его аппликация вызывает эндотелий-зависимую вазодилатацию, величина которой не зависит от интенсивности механического стимула. 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 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). Ранее было показано, что такое воздействие ферментов на интиму сосуда вызывает значительное повреждение или полное устранение эндотелиального гликокаликса [15, 16]. После перфузии артерии раствором, содержащим разрушающий гликокаликс фермент, возвращались к перфузии первоначальным перфузионным раствором и производили те же измерения с изменяющимся потоком и воздействием ацетилхолина, что и в контроле.

## 2.2. Эксперименты на культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека

Ориентацию клеток по потоку в зависимости от состояния эндотелиального гликокаликса проводили на культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Клетки выделяли из вены, очищали и выращивали на пластиковых стёклах до получения конфлуентного монослоя. В работе использовали клетки 2–3 пассажей. Перед перфузией на фазово-контрастном микроскопе (Nikon) регистрировали 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/см<sup>2</sup>. 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.

## 3. Результаты работы

### 3.1. Эксперименты на перфузируемых *in vitro* магистральных артериях кролика

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

### 3.2. Эксперименты на культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека

После 24-часовой перфузии эндотелиоцитов под высоким напряжением сдвига ( $\sim 20$  дин/см<sup>2</sup>) наблюдалось 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  $30^\circ$  от направления течения перфузата (рис. 3). Клетки, обработанные ферментами, после 24 ч перфузии сохранили неправильную форму без какой-либо определённой ориентации, как и до приложения сдвигового напряжения (рис. 4).

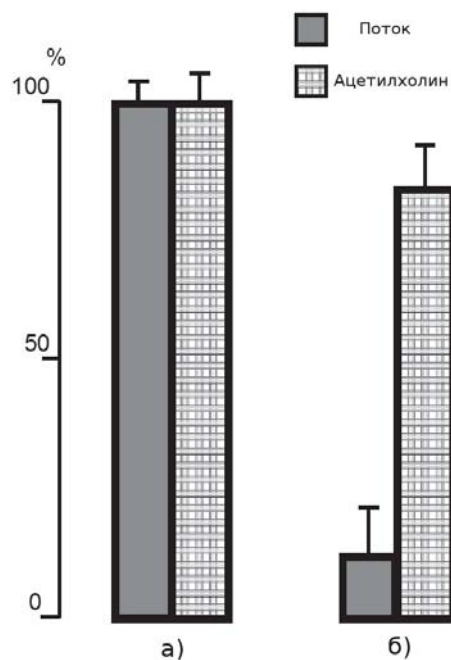


Рис. 2. Влияние повреждения гликокаликса на расширение сонной артерии кролика, вызванное увеличением расхода раствора и ацетилхолином. Слева — артерии с интактным гликокаликсом, справа — артерии после перфузии в течение двух часов раствором, содержащим 0,25 мМ гепарины III

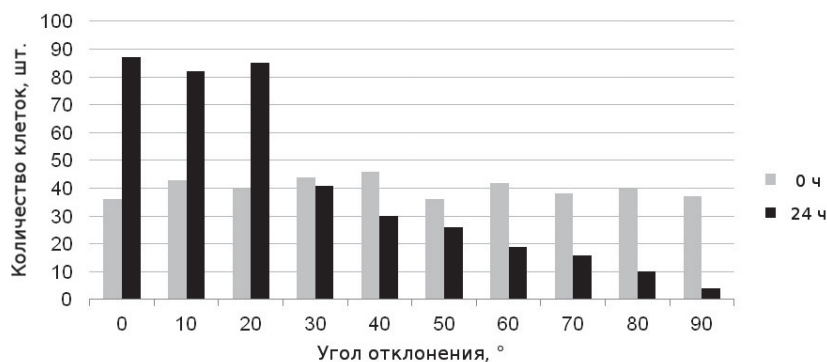


Рис. 3. Ориентация клеток (HUVEC) с интактным гликокаликсом до (светлые столбики) и после (тёмные столбики) 24-часового воздействия напряжения сдвига (20 дин/см<sup>2</sup>)

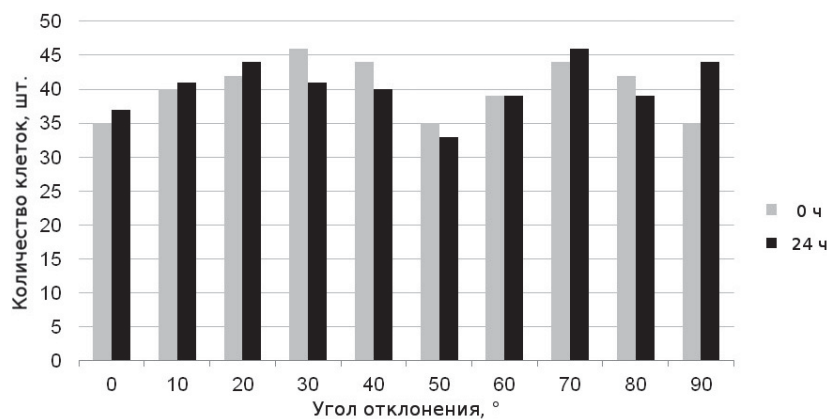


Рис. 4. Ориентация клеток (HUVEC) с ферментативно повреждённым гликокаликсом до и после 24-часового воздействия напряжения сдвига (20 дин/см<sup>2</sup>)

#### 4. Обсуждение результатов

Данные, полученные в экспериментах на перфузируемых *in vitro* магистральных артериях кроликов, показывают, во-первых, что направленное разрушение гликокаликса не затрагивает сам процесс выделения эндотелиоцитами вазоактивных веществ, поскольку не выявлено значимое изменение величины ответа на ацетилхолин, который индуцирует выделение оксида азота. Во-вторых, результаты экспериментов подтверждают, что эндотелиальные клетки способны реагировать изменением диаметра на увеличение сдвигового напряжения лишь в присутствии интактного гликокаликса, поскольку при его повреждении способность сосуда регулировать свой диаметр в соответствии с напряжением сдвига практически утрачивается. Таким образом, проведённое исследование позволяет утверждать, что именно гликокаликс является ключевым звеном механогенной регуляции сосудистого тонуса, опосредуемой эндотелием.

Результаты исследования ориентации клеток эндотелия в культуре при воздействии напряжения сдвига показывают, что клетки с интактным гликокаликсом упорядочивают свою ориентацию и выстраиваются параллельно потоку жидкости в камере, в то время как клетки с повреждённым гликокаликсом не ориентируются в сдвиговом потоке жидкости. Эти данные свидетельствуют о том, что эндотелиоциты способны реагировать изменением своей формы и ориентации только при наличии неповреждённого 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. *Melkumyants A.M., Balashov S.A., Khayutin V.M.* Endothelium-dependent control of arterial diameter by blood viscosity // *Cardiovasc. Res.* 1989. V. 23. P. 741–747.
2. *Melkumyants A.M., Balashov S.A.* Effect of blood viscosity on arterial flow induced dilator response // *Cardiovasc. Res.* 1990. V. 24. P. 165–168.
3. *Ignarro L.J., Buga G., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 9265–9269.
4. *Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.* 1987. V. 237. P. 524–526.
5. *Thi M.M., Tarbell J.M., Weinbaum S., Spray D.C.* The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a «bumper-car» model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 16483–16488.
6. *Weinbaum S., Zhang X., Han Y., Vink H., Cowin S.C.* Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 7988–7995.
7. *Florian J.A., Kosky J.A., Ainslie K., Pang Z., Dull R.O., Tarbell J.M.* Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells // *Circulat. Res.* 2003. V. 93. P. 136–142.
8. *Collins S.R., Blank R.S., Deatherage L.S., Dull R.O.* The endothelial glycocalyx: Emerging concepts in pulmonary edema and acute lung injury // *Anesthesia and Analgesia.* 2013. V. 117, N 3. P. 664–674.
9. *Ebong E.E., Macaluso F.R., Spray D.S., Tarbell J.M.* Imaging the endothelial glycocalyx *in vitro* by rapid freezing/freezing substitution electron microscopy // *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 36. P. 1908–1915.

10. *Barker A.L., Konopatskaya O., Neal C.R., Macpherson J.V., Whatmore J.L., Winlove C.P., Unwin P.R., Shore A.C.* Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004. V. 6, N 5. P. 1006–1011.
11. *Adamson R.H., Clough G.* Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels // *J. Physiol.* 1992. V. 445. P. 473–486.
12. *Melkumyants A.M., Balashov S.A., Veselova E.S., Khayutin V.M.* Continuous control of the lumen of feline conduit arteries by blood flow rate // *Cardiovasc. Res.* 1987. V. 21. P. 863–870.
13. *Рогоза А.Н.* Емкостный датчик для измерения диаметра сосудов // *Бюлл. exper. биол. мед.* 1981. № 5. С. 596–599.
14. *Гришанов Ю.Н., Евстифеев И.К., Мелькумянц А.М., Хаяутин В.М.* Автоматическая стабилизация давления в крупных артериях при изменениях кровотока // *Бюлл. exper. биол. мед.* 1982. № 94. С. 121–123.
15. *Henry C.B., Duling B.R.* Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. H508–H514.
16. *Vogel J., Sperandio M., Pries A.R., Linderkamp O., Gaehtgens P., Kuschinsky W.* Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice // *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2000. V. 20. P. 1571–1578.

## References

1. *Melkumyants A.M., Balashov S.A., Khayutin V.M.* Endothelium-dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovasc. Res.* 1989. V. 23. P. 741–747.
2. *Melkumyants A.M., Balashov S.A.* Effect of blood viscosity on arterial flow induced dilator response. *Cardiovasc. Res.* 1990. V. 24. P. 165–168.
3. *Ignarro L.J., Buga G., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 9265–9269.
4. *Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987. V. 237. P. 524–526.
5. *Thi M.M., Tarbell J.M., Weinbaum S., Spray D.C.* The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a «bumper-car» model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 16483–16488.
6. *Weinbaum S., Zhang X., Han Y., Vink H., Cowin S.C.* Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 7988–7995.
7. *Florian J.A., Kosky J.A., Ainslie K., Pang Z., Dull R.O., Tarbell J.M.* Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulat. Res.* 2003. V. 93. P. 136–142.
8. *Collins S.R., Blank R.S., Deatherage L.S., Dull R.O.* The endothelial glycocalyx: Emerging concepts in pulmonary edema and acute lung injury. *Anesthesia and Analgesia.* 2013. V. 117, N 3. P. 664–674.
9. *Ebong E.E., Macaluso F.R., Spray D.S., Tarbell J.M.* Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution electron microscopy. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 36. P. 1908–1915.
10. *Barker A.L., Konopatskaya O., Neal C.R., Macpherson J.V., Whatmore J.L., Winlove C.P., Unwin P.R., Shore A.C.* Observation and characterisation of the glycocalyx of viable

- human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004. V. 6, N 5. P. 1006–1011.
11. *Adamson R.H., Clough G.* Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels. *J. Physiol.* 1992. V. 445. P. 473–486.
  12. *Melkumyants A.M., Balashov S.A., Veselova E.S., Khayutin V.M.* Continuous control of the lumen of feline conduit arteries by blood flow rate. *Cardiovasc. Res.* 1987. V. 21. P. 863–870.
  13. *Rogoza A.N.* Contact transducer for continuous measurement of the diameter of blood vessels. *Bull. expert. biol. med.* 1981. N 5. P. 596–599.
  14. *Grishanov Y.N., Evstifeev I.K., Melkumyants A.M., Khayutin V.M.* Automatic pressure stabilisation in large arteries during the changes in blood flow. *Bull. expert. biol. med.* 1982. N 94. P. 121–123.
  15. *Henry C.B., Duling B.R.* Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. H508–H514.
  16. *Vogel J., Sperandio M., Pries A.R., Linderkamp O., Gaehtgens P., Kuschinsky W.* Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2000. V. 20. P. 1571–1578.

Поступила в редакцию 17.02.2017