

© Коллектив авторов, 2017
УДК 576.524, 57.053, 616-092.18

Московцев А.А.^{1,3}, Колесов Д.В.¹, Мильникова А.Н.²,
Зайченко Д.М.¹, Соколовская А.А.¹, Кубатиев А.А.^{1,3}

Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Балтийская, 8

² ФГБОУВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва, Миусская площадь, д.9

³ ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва

Эндотелиальные клетки, выстилающие стенки сосудов, являются одними из важнейших регуляторных элементов кровеносной системы. Непосредственно соприкасаясь с потоком крови, эти механочувствительные клетки способны детектировать свою деформацию через ее тангенциальный компонент (сдвиг) и составляющую, направленную по нормали к поверхности (растяжение). Деформация сдвига является ключевым индуктором комплекса сигнальных путей, опосредуемых тирозинкиназами, интегринами, ионными каналами, вовлекающих также мембранные липиды, гликокаликс и другие клеточные компоненты. На фоне достаточно большого количества данных о сигнальной трансдукции, в литературе меньше внимания уделено клеточной адаптации к сдвиговой деформации и сравнительно мало информации об участии генов стрессового ответа. Гидродинамические условия в определенных зонах сосудистой системы характеризуются значительной неоднородностью, что может приводить к ослаблению обратных связей, необходимых для поддержания гомеостаза в эндотелиальных клетках. Это может способствовать развитию заболеваний, например, таких, как атеросклероз. В обзоре обсуждаются новые аспекты и концепции, связанные с ответами эндотелиоцитов на сдвиговую деформацию и основные методы анализа эффектов сдвиговой деформации *in vitro*. **Цель исследования.** Обобщение современных данных о механизмах механочувствительности и механотрансдукции эндотелия. **Результаты.** В обзоре изложены основные механизмы механочувствительности клеток эндотелия, пути внутриклеточной передачи сигнала, рассмотрено вовлечение механизмов стрессового ответа клеток и адаптации. Обсуждаются эксперименты по изучению молекулярных основ механотрансдукции, в том числе белков и других молекул, вовлеченных в детектирование, передачу сигнала и клеточный ответ на сдвиговую деформацию.

Ключевые слова: эндотелий, сдвиговая деформация, механотрансдукция, клеточный стресс, адаптация.

Для цитирования: Московцев А.А., Колесов Д.В., Мильникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 112–125.

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8531

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, ФГБНУ НИИОПП Балтийская ул., 8, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, номер проекта 16-04-01807

Поступила 11.12.2016

Moskovtsev A.A.^{1,3}, Kolesov D.V.¹, Mylnikova A.N.²,
Zaychenko D.M.¹, Sokolovskaya A.A.¹, Kubatiev A.A.^{1,3}

Endothelial shear stress responses: mechanotransduction, cell stress and adaptation

¹ FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

² Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya sq., Moscow, 125047, Russia

³ Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Moscow, Russia

Endothelial cells lining the walls of blood vessels are one of the most important regulatory elements of the circulatory system. These mechanosensitive cells are in a direct contact with the flow of blood and able to detect deformation through its tangential component (shear) and the component directed along the normal to the surface (tension). Shear stress is the key inducer of the complex of signaling pathways mediated by tyrosine kinases, integrins, ion channels, involving also membrane lipids, glycocalyx and other cellular components. There are large amount of data on signal transduction in the literature, but less attention is paid to cellular adaptation to shear stress and there is relatively little information on the involvement of stress response genes in that process. Hydrodynamic conditions in certain zones of the vascular system are characterized by consid-

erable heterogeneity, which can lead to weakening of feedbacks necessary for maintaining homeostasis in endothelial cells. This can contribute to the development of diseases such as atherosclerosis. This review presents new aspects and concepts related to the responses of endotheliocytes to shear stress and, in addition, highlights the basic methods of analyzing the effects of shear stress *in vitro*. **Purpose of the study.** Generalization of modern data on mechanisms of mechanosensitivity and mechanotransduction of the endothelium. **Results.** The review outlines the main mechanosensitivity mechanisms of endothelial cells, the pathways of intracellular signaling, the involvement of mechanisms of cellular stress response and adaptation. There are descriptions of experiments in which the molecular basis of mechanotransduction is identified, including the determination of proteins and other molecules involved in detection, signal transduction, and cellular response to shear stress.

Keywords: endothelium, shear stress, mechanotransduction, cell stress, adaptation.

For citation: Moskovtsev A.A., Kolesov D.V., Mylnikova A.N., Zaychenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Endothelial shear stress responses: mechanotransduction, cell stress and adaptation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61(4): 112–125. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8531

For correspondence: Aleksey A. Moskovtsev, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: bioinf@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. This work has been supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR grant № 16-04-01807 A)

Information about authors: (сведения о регистрации на сайте — orcid, ассоциированном со Scopus)

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 11.12.2016

Введение

Сосудистая система, обеспечивающая активный массоперенос, — важное эволюционное приобретение, позволившее многоклеточным организмам преодолеть ограничения, связанные с низкой скоростью диффузии, и благодаря этому строить сложные ткани и органы с интенсивным метаболизмом. С другой стороны, регулирование работы сосудистой системы осложнено изменяющимися запросами различных тканей, неоднородностью гидродинамических условий, возникающей на протяжении сосудистого русла. Направленный пульсирующий поток находящейся под давлением крови в ветвящихся сосудах представляет собой сложную гидродинамическую систему, исследование которой сопряжено с рядом трудных вопросов, таких, как турбулентность и неньютоновский характер жидкости. В связи с этим исследование гидродинамических особенностей кровеносной системы млекопитающих, как одной из наиболее развитых систем у животных, представляет собой чрезвычайно актуальную проблему, так как она сосредотачивает в себе ряд пока еще недостаточно изученных решений по регуляции активного массопереноса, сформированных в ходе длительной эволюции.

Одними из важнейших регуляторных элементов кровеносной системы являются эндотелиальные клетки, выстилающие стенки сосудов. Эндотелиальные клетки в действующем сосуде находятся в поле сил, генерируемых потоком крови и компенсируемых упругими свойствами клеток сосуда и окружающих

тканей, а также давлением интерстициальной жидкости. Следует отметить, что упругие свойства стенок крупных сосудов артериального звена можно считать постоянными («пассивная эластичность»), в то время как эластичность стенок более мелких артерий может изменяться благодаря сократимым гладкомышечным элементам. Эти мелкие артерии, или артерии сопротивления, в существенной степени определяют артериальное давление. Интересно, что при синдроме Вильямса, который характеризуется синтезом укороченных форм эластина с некоторыми отсутствующими доменами, происходит сужение крупных артерий, вызванное аномальным разрастанием вокруг артерий гладкой мускулатуры.

Эндотелиоциты являются механочувствительными клетками: непосредственно соприкасаясь с потоком крови, они способны детектировать деформацию, возникающую в результате тока крови, ее нормальную составляющую, обусловленную гидростатическим давлением, и тангенциальный компонент (сдвиговая деформация, ориентированная по касательной к поверхности) [1, 2]. Механочувствительность необходима эндотелию для выполнения одной из своих важнейших функций — управления местным кровотоком. Для этого эндотелиальные клетки должны регистрировать направление и величину действующей в трех измерениях и меняющейся во времени механической силы, создаваемой потоком. Кроме того, клетки должны интегрировать полученную информацию для формирования своевременного ответа, выражающегося в пере-

стройке собственного функционирования (адаптации) и выработке управляющего воздействия на сократительные элементы сосуда. Для формирования ответа на механическое воздействие эндотелиальные клетки должны быть способны к кодированию величины и направления механического воздействия в химические сигналы, т.е. к механотрансдукции.

Фундаментальным свойством кровеносной системы является ее ветвление, которое, влечет за собой существенную неоднородность условий для эндотелиальных клеток. Атеросклеротические бляшки обычно развиваются в местах ветвлений и бифуркаций крупных артерий эластического и мышечного типов, где на очень коротких расстояниях происходит существенное изменение поперечного сечения сосудистого русла, а также в зонах с нелинейной геометрией — таких, как дуга аорты [3]. Кровоток в этих регионах имеет сложный пространственный и временной характер, для него свойственны низкая интенсивность сдвиговой деформации, реверсия направления на фоне колебаний давления, обусловленных сердечным циклом. Эндотелиоциты в определенных случаях, возможно, могут «воспринимать» подобные гидродинамические условия как патологические. Детальное понимание процессов рецепции, трансдукции и ответов клеток на механическое воздействие позволило бы уточнить роль гемодинамики в возникновении сосудистых заболеваний. Однако, несмотря на длительную историю исследований, до сих пор не существует консенсуса относительно того, какие процессы и структуры могут участвовать в механотрансдукции, и каков порядок их значимости в этом процессе.

Домены эндотелиальных клеток

Эндотелиоцит — поляризованная клетка, в которой можно выделить апикальный (люминальный), базальный и латеральные домены. Эндотелиальные клетки представляют собой интерфейс между кровью и тканью (стенкой сосуда), формируют фактически двумерную ткань и склонны к расплыванию на субстрате — базальной мембране [4], поддерживая при этом сравнительно небольшую высоту. Однако, в зависимости от типа эндотелия, его высота может сильно варьировать — в целом, хорошо известна как функциональная, так и морфологическая гетерогенность эндотелия.

Эндотелиальная клетка в определенном диапазоне действующих сил имеет упругие свойства и способность к обратимой деформации, т.е. может быть охарактеризована как твердое тело, реагирующее на изменение объема и формы. Однако такие компоненты клетки, как мембраны, обладают текучестью. В зависимости от величины действующей силы, деформиру-

ваться могут различные структуры клетки, что потенциально может формировать целый спектр клеточных ответов. Необходимо также отметить, что эндотелиоциты, как и все субстрат-зависимые клетки, т.е. растущие на «подложке», постоянно находятся в состоянии механического напряжения, связанного с поддержанием формы. Это напряжение возникает в результате взаимодействия цитоскелета с другими областями клетки, такими, как ядро, соседние клетки, места адгезии к матриксу (субэндотелиальному) [5].

Гликокаликс.

Строение и функции, участие в механорецепции

Первой, поверхностной структурой эндотелиального слоя, непосредственно граничащей с потоком, является гликокаликс. Он представляет собой гидратированный гелеобразный слой толщиной приблизительно 500 нм, состоящий из сульфатированных протеогликанов, гиалуронана, гликопротеинов, — полимерных молекул, которые формируют его матрицу, а также адгезированных к ней белков плазмы [см. обзор [6].

В экспериментах на мелких сосудах и капиллярах *m. Cremasteri* с использованием флуоресцеин изотиоцианат-меченого декстрана с молекулярной массой 70 кДа в качестве контрастирующего агента было показано, что высота гликокаликса в 500 нм характерна для капилляров и может существенно снижать «функциональный» диаметр сосуда, составляя 10%—20% его величины [7]. При движении эритроцита по сосуду расстояние между ним и стенкой сосуда растет при увеличении линейной скорости эритроцита, и эта величина в какой-то момент может быть больше высоты гликокаликса [7]. При остановке потока, эритроцит занимает весь просвет сосуда, видимо, деформируя гликокаликс; в противоположность этому лейкоциты и в динамических, и в статических условиях занимают весь просвет, по-видимому, также «сминая» гликокаликс, однако его толщина восстанавливается в течение 0,5 с после прохода лейкоцитов [7]. Мембраны эритроцитов довольно лабильны, и остается открытым вопрос о том, чем обусловлен столь быстрый коллапс гликокаликса при остановке эритроцита [6].

Таким образом, предполагается, что при остановке движения эритроцита происходит существенная компрессия гликокаликса, что может генерировать впоследствии значительно большую подъемную силу, чем предполагалось ранее [8]. Наличие силы отталкивания может объяснить отсутствие адгезии эритроцитов к плазмалемме эндотелия [8]. Характер изменений гликокаликса при остановке эритроцита согласуется с интересным феноменом так называемого «pop-out» (всплывания, подъема) эритроцита из гли-

кокаликса после возобновления движения и, затем, выше толщины гликокаликса при дальнейшем увеличении его скорости с предположительным формированием слоя между эритроцитом и гликокаликсом, который может выполнять функцию лубриканта. Была проведена интересная аналогия между скольжением лыжника по снегу и движением эритроцита по гликокаликсу [8]. Следует отметить важную для патогенеза многих сосудистых заболеваний относительную нестабильность гликокаликса: в ряде работ отмечалась быстрая его деградация при действии физических и химических факторов на эндотелий, при этом конечным действующим фактором, по-видимому, были активные формы кислорода [6].

Структура гликокаликса формируется «тангенциальными» компонентами, которые упрощенно можно представить лежащими в плоскости, параллельной стенке сосуда, а также компонентами, направленными по нормали к ней. Первые представляют собой гликозаминогликаны (ГАГ): гепарансульфат (ГС), который составляет от 50 до 90% ГАГ на поверхности эндотелиальных клеток, хондроитинсульфат, дерматансульфат, гиалуронан [6]. ГАГ гликокаликса, как известно, в основном несут отрицательный заряд и, за исключением гиалуронана, ковалентно ассоциированы с плазматической мембраной (см. ниже). Цепи гепарансульфата могут связывать широкий спектр внеклеточных лигандов с высокой аффинностью (K_D в диапазоне 1—100 нМ), при этом связывание довольно устойчиво к солям в физиологических концентрациях [9]. Гиалуронан — гораздо более длинный несulfатированный дисахаридный полимер, имеющий медиану молекулярных масс порядка 1000 кДа, он не имеет ковалентных связей с коровыми белками (см. ниже), а взаимодействует с рецепторами, например, CD44.

Компоненты, ориентированные по нормали к просвету сосуда, выполняют важную структурную функцию и представлены коровыми белками — синдеканами, глипиканами, ковалентно связанными с ГАГ. Эти два белковых семейства имеют ряд существенных отличий, среди которых организация их внеклеточных (экто) доменов. Эктодомены синдеканов — преимущественно вытянутые пролин-богатые структуры, которые имеют два сайта связывания ГАГ — на относительно большом отдалении от мембраны (для гепарансульфата) на N-конце и непосредственно у мембраны для хондроитинсульфата; эктодомены глипиканов — глобулярные структуры, богатые цистеином, имеющие от 3 до 4 областей связывания ГАГ в непосредственной близости от мембраны [9]. В составе синдеканов — трансмембранные домены, в то время как глипиканы присоединены к одному «листка» мембраны посредством гликозилфосфатидилинозитольного (ГФИ) «якоря», т.е. они не пенетрируют

липидный бислой [9]. ГФИ «привязывает» глипикан к липидным рафтам и, в частности, кавеолам (100-нанометровым полостям, формируемым плазмалеммой, богатой холестерол-связывающим белком кавеолином-1).

Вероятно, топологические отличия эктодоменов синдеканов и глипиканов определяют и их функциональную диверсификацию. Так, например, экспрессия синдеканов, но не глипиканов, снижает способность опухолевых клеток к инвазии в коллагеновый гель (коллаген I типа) [10].

В гликокаликсе участвуют также различные трансмембранные гликопротеины, экстраклеточные домены которых ковалентно связаны с ветвящимися олигосахаридами с концевыми сиаловыми кислотами — 9-углеродными моносахаридами, диссоциирующими при физиологическом pH, что усиливает суммарный отрицательный заряд гликокаликса [6].

Трехмерная сеть ГАГ гликокаликса может выступать в виде депо для различных лигандов и модуляторов функционального состояния эндотелия. Следует еще раз подчеркнуть, что гликокаликс представляется динамичной структурой со многими «степенями свободы». Так, вариации ионной силы, pH, состава катионов приводят к конформационным перестройкам полимеров гликокаликса и изменениям их взаимодействия. Кроме того, в результате действия ряда ферментов, может иметь место так называемый шеддинг, или «срезание» эктодоменов. Конститутивный протеолитический шеддинг эктодоменов синдеканов с поверхности клеток происходит как в культуре, так и в физиологических условиях, шеддинг эктодоменов глипиканов также имеет место в культуре клеток, но меньше известно о ситуации с эктодоменами глипиканов *in vivo* [9].

Важным аспектом функционирования гликокаликса является то, как коровые белки могут передавать сигналы. С учетом вышеописанных топологий C-концевых доменов (располагающихся в структурах клетки), они делают это неодинаково. Цитоплазматические домены трансмембранных синдеканов взаимодействуют с белками цитоскелета и сигнальными молекулами; глипиканы же могут передавать информацию только через ассоциацию с трансмембранными белками, имеющими сигнальную функцию или через взаимодействие с липидными мессенджерами [9].

Сравнительно недавно была установлена ультраструктурная организация гликокаликса эндотелия и его связи с актиновым цитоскелетом. Доминирующим мотивом в нем оказалась квазипериодическая структура — гексагональная решетка с расстоянием в 20 нм между заякоренными в клеточных структурах коровыми белками, которые имеют диаметр около 10 нм без учета цепей полисахаридов и ГАГ, образующих кустоподобные структуры, последние как раз и

формируют типичный шаг в 20 нм [6, 11]. Предполагается, что эта решетка упорядоченных волокон гликокаликса может функционировать как молекулярное сито. Описанная структура находится в связи с цитоскелетом эндотелия так, что фокусы цитоскелета образуют с цитоплазматической стороны регулярную решетку с расстоянием 100 нм.

Было предложено несколько моделей, описывающих свойства и функционирование эндотелиального гликокаликса. Согласно онкотической модели, коллоидно-осмотическое давление, возникающее при адсорбции белков плазмы на гликокаликсе, достаточно для исключения эритроцитов из зоны гликокаликса, т.е., функционирование и восстановление гликокаликса в большей степени зависят от сил химической природы, а не механических. В эластогидродинамической модели жесткость на изгиб волокон гликокаликса обуславливает функционирование гликокаликса в качестве сита и для противодействия сдвиговой деформации [6]. В механо-электрохимической модели восстановление гликокаликса происходит из-за возникающего градиента электрохимического потенциала, который включает в себя химический и электростатический компоненты.

Существующие данные указывают на то, что поток в слое гликокаликса незначителен [6], и величина сдвиговой деформации на уровне мембраны весьма мала. Кроме того, нарушение структурной целостности гликокаликса приводит к полной отмене химической сигнализации и реорганизации цитоскелета при действии сдвиговой деформации, что указывает на важнейшую роль гликокаликса в механотрансдукции [12].

Механотрансмиссия —

передача сил гликокаликсом на цитоскелет

Гликокаликс представляется важной структурой эндотелия, осуществляющей передачу механического напряжения, возникающего при действии потока, на внутренние структуры клетки и, прежде всего, цитоскелет. Передача механического напряжения на цитоскелет сопровождается его перестройками и активацией ряда сигнальных путей.

Ключевыми элементами в процессе передачи деформации от гликокаликса к цитоскелету выступают [12]:

- трансмембранные протеогликаны гликокаликса — синдеканы, связанные с актиновыми волокнами (F-актином);
- кортикальная актиновая сеть (actin cortical web, ACW) на люменальной стороне эндотелия;
- адгерентные клеточные контакты на латеральных сторонах клеток и связанные с ними адгезивные пояски, плотные периферические актиновые полоски (dense peripheral actin band, DPAB), формирующие «опору» для ACW;

- базальные фокальные контакты и базальные протеогликаны, связанные с интегринами люменального домена и межклеточными контактами латеральных доменов посредством стрессовых волокон.

В исследовании [12] путем изменения состава перфузируемой среды (добавление бычьего сывороточного альбумина (БСА) или эмбриональной телячьей сыворотки), а также с помощью гепариназы была показана связь между ACW, DPAB и альфа-актинин-содержащими стрессовыми волокнами с вовлечением опосредующих связывание белков, таких как винкулин, паксиллин и других [12]. Следует отметить, что гепариназа способна существенно ингибировать продукцию эндотелием оксида азота, вызванную сдвиговой деформацией (СД). Предполагается, что при превышении пороговой величины сдвиговой деформации, кортикальная сеть ACW, связанная с гликокаликсом, растягивает адгерентные контакты, что вызывает разборку актиновых структур, связанных с ними, т.е. фактически имеет место разъединение адгерентных контактов и плотных периферических актиновых полосок. Высвобожденный актин участвует в образовании стрессовых волокон, включая базальные, кроме того, формируются дополнительные фокальные адгезии. В зонах высоких сдвиговых деформаций были зарегистрированы разрывы плотных контактов. При деградации гликокаликса на фоне действия гепариназы III не наблюдалась перестройка актинового цитоскелета, перераспределение винкулина, разрывы плотных и щелевых контактов в потоке [12]. Описанные изменения имели место в потоке в среде с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, а также в среде с добавлением 1% БСА, что обеспечивало, по мнению авторов, нативное состояние гликокаликса. Для оценки состояния плотных и щелевых контактов были использованы антитела к белкам ZO-1 и Sx43, при действии сдвиговой деформации наиболее заметными были деформации и разрывы визуализируемых участков с ZO-1 [12].

Предполагается, что сигнальный компонент при передаче сдвиговой деформации в эндотелии может существенно различаться в случае непосредственного участия апикальной плазмалеммы на фоне коллапса гликокаликса или полноценного вовлечения гликокаликса. Действительно, могут отличаться механорецепторы и задействованные сигнальные пути. При участии гликокаликса важными «передатчиками» могут выступать синдеканы (синдекан-I) благодаря хорошо развитым экстраклеточным доменам и наличию цитоплазматического домена, связывающего фибриллярный актин [12].

Плазмалемма имеет низкую структурную жесткость, в потоке может наблюдаться эффект деформации мембран в виде «ряби», но маловероятно, что она может выступать эффективным посредником в передаче механического воздействия на ACW [12].

Тем не менее, важно отметить, что с точки зрения механики участие или неучастие гликокаликса, по-видимому, мало влияет на результирующую силу, приложенную к базальной поверхности эндотелия в начальных фазах воздействия сдвига. Однако впоследствии это может иметь более существенное значение в связи с опосредуемым механосенсорами и сигнальными путями включением адаптивных механизмов, компенсирующих силы деформации.

При воздействии сдвиговой деформации в гликокаликсе был отмечен ряд изменений. Было показано, что в статических условиях гепарансульфат покрывает большую часть апикальной поверхности RFPEC (rat fat pad endothelial cells) клеток, при прикладывании сдвиговой деформации величиной 1,5 Па в течение 10 мин он перемещается по потоку к краям клеток и кластеризуется на границах клеток через 30 мин [13]. После 24-часового воздействия ГС снова появляется в центральных регионах клеточной поверхности, однако кластеризация на границах по-прежнему сохранялась, при этом содержание ГС выросло на 43% по сравнению со статическим контролем, что было обусловлено ростом его синтеза [13]. Следует отметить, что существенного изменения морфологии не происходило при длительном воздействии — эндотелиальные клетки поддерживали характерный вид «бульжной мостовой» в отличие от ВАЕС (Bovine aortic endothelial cells) клеток, принимавших веретенообразную форму, ориентированную по потоку. ВАЕС также демонстрировали похожее перераспределение ГС при действии как краткосрочной (30 мин), так и продолжительной (24 ч) сдвиговой деформации [13].

Распределение хондроитинсульфата при краткосрочном действии сдвиговой деформации существенно не отличалось от статического контроля [13]. При 24 ч-сдвиговой деформации границы клеток становились менее однородными, «пенетрированными». Распределение глипикана не менялось при действии как краткосрочной, так и 24 ч-сдвиговой деформации, однако наблюдалось падение его содержания на 30 мин, а затем повышение на 50% по сравнению со статическим контролем [13]. Заметных изменений в распределении синдекана-1 при действии сдвиговой деформации не было отмечено, его уровень за 24 ч вырос на 63% [13]. Также было обнаружено существенное увеличение содержания кавеолина-1 в центре апикальной части клеток при продолжительной сдвиговой деформации на фоне его синтеза и перемещения от базальной части к апикальной [13].

Сдвиговая деформация вызывала перераспределение ганглиозида GM1 к границам клеток и рост его содержания, что характеризовало «поведение» липидных мембранных рафтов [13].

Наиболее существенные изменения при действии сдвиговой деформации были отмечены в актиновом

цитоскелете. В статических условиях в клетках хорошо визуализировались периферические актиновые полоски по краям клеток. СД приводила к формированию стрессовых волокон, параллельных ближайшему краю клетки на фоне существенного увеличения его синтеза уже на ранних временах; при этом отмечалось образование ламеллиподий и филоподий, а плотные периферические полоски постепенно исчезали [13]. Дезорганизация актина с помощью цитохалазина D блокировала восстановление гепарансульфата на апикальной поверхности клеток при 24-часовом действии сдвиговой деформации [13].

Таким образом, в действии сдвиговой деформации на цитоскелет эндотелиальных клеток, можно выделить несколько фаз. В краткосрочном периоде происходит актин-независимая кластеризация на границах клеток «по потоку» липидных рафтов с заякоренным глипиканом, при этом нет заметных изменений в распределении трансмембранных синдеканов, связанных с актиновым цитоскелетом, а также кавеол, так как большая по сравнению с мембраной структурная жесткость цитоскелета обеспечивает противодействие сдвиговой деформации на начальном периоде воздействия [13]. Тем не менее, по-видимому, происходит передача и перераспределение силы по цитоскелету, что может приводить к сравнительно быстрым перестройкам цитоскелета, в частности, к исчезновению периферических актиновых полосок в базальном домене клеток, однако, при их сохранении в апикальной части. Наиболее существенным изменением актинового цитоскелета является образование стрессовых волокон, вполне заметных через 30 мин и ориентированных параллельно ближайшему краю клеток с дальнейшей тенденцией увеличения их количества и более равномерного распределения на длительных сроках сдвиговой деформации [13].

Важным аспектом адаптации клеток к сдвиговой деформации являются структурные изменения в мембране. Кроме упомянутой выше ранней кластеризации заякоренных в липидных рафтах глипиканов, после 24-часового воздействия было обнаружено существенное увеличение экспрессии кавеолина-1 в апикальном стеке в центральной части клеток [13]. Восстановление распределения глипикана-1, увеличение экспрессии кавеолина и числа кавеол в центральной части клеток может быть согласовано с перестройками актинового цитоскелета, так как последний стабилизирует структурный белок кавеол — кавеолин-1, а также трансмембранный синдекан-1 [13].

В целом, при длительном действии сдвиговой деформации было отмечено довольно значительное увеличение синтеза глипикана, синдекана, кавеолина, актина [13], что свидетельствует о существенных длительных изменениях генной экспрессии.

Механотрансмиссия. Клеточные контакты

Сдвиговая деформация представляет собой комплексное воздействие, и эндотелиальная клетка обладает системой разнородных механосенсоров, необходимых ей для интеграции и правильной «интерпретации» паттернов и действующих на клетку силовых полей. Сопряженный с гликокаликсом цитоскелет связывает также межклеточные контакты и соединения клетки с внеклеточным матриксом в единую систему перераспределения механических нагрузок. Ключевыми участниками этой системы являются фокальные адгезии (базальный домен), плотные и адгезивные контакты (латеральные домены). Таким образом, механическое усилие, приложенное к апикальной поверхности клеток, перенаправляется на указанные структуры, а также инициирует ряд химических сигналов (см. ниже).

Фокальные адгезии (ФА) — сложные белковые комплексы, важным участником которых является интегрин, обеспечивающие взаимодействие между актиновым цитоскелетом и внеклеточным матриксом. Кроме того, это взаимодействие регулирует ряд сигнальных путей, которые, таким образом, являются интегрин-зависимыми.

Среди них Rho ГТФаза — опосредованный путь. Было показано наличие двух фаз в регуляции активности Rho на фоне активации интегрин $\alpha_v\beta_3$ [14]: после увеличения сдвиговой деформации с 0 до 1,2 Па на культуре эндотелиальных клеток бычьей аорты после короткого 2-минутного лаг-периода наблюдалось снижение активности Rho в течение интервала 5—15 мин с последующим ростом и достижением пика на 60-й минуте действия СД. Начальное снижение активности соответствовало снижению числа стрессовых волокон, повышение — росту числа последних, что определялось путем химической фиксации клеток и окраской фаллоидином, меченым родамином [14]. Увеличение числа стрессовых волокон совпадало со значительным выравниванием клеток по потоку, однако, выравнивание в целом требует более продолжительного времени. Следует отметить, что Rho активность снизилась на 120-й мин, хотя актиновые стрессовые волокна сохранялись. Авторы предполагают, что максимум ее активности необходим на этапе сборки стрессовых волокон, более низкой активности достаточно для их поддержания. В целом, наблюдаемая фазность изменений активности Rho была очень похожа на процессы распластывания клеток по фибронектину — начальное падение активности в фазе активного распластывания, когда цитоскелет высокодинамичен; максимум активности, когда стрессовые волокна и фокальные адгезии собраны, и постепенное возвращение к базальному уровню [15]. Активация интегрин $\alpha_v\beta_3$ наблюдалась на базаль-

ной поверхности клеток — авторы предполагают, что эндотелиальные клетки выработали механизмы по подавлению экспрессии высокоаффинных интегрин на люменальной (апикальной) поверхности по причине того, что могли бы быть тромбогенными. Сдвиговая деформация вызывала также образование ламеллиподий.

Поведение клеток при действии сдвиговой деформации имеет ряд общих черт с процессами клеточной адгезии, таких как профиль активации интегрин-зависимых сигнальных каскадов. При адгезии клеток в начальной фазе активации интегрин и вовлечения новых интегрин, перестройка зон фокальной адгезии не имеет определенной пространственной направленности в отличие от перестройки ФА по потоку при СД [16, 17].

Возникновение зоны ФА подробно описано в обзоре [17]. Образование раннего адгезивного контакта, т.е. первичного взаимодействия между интегрин и матриксом, происходит независимо от силы, но после связывания интегрин присоединяются к актиновому цитоскелету, что индуцирует талин-опосредуемое увеличение силы адгезии на 2 пН; затем происходит активация ГТФаза Rac и Cdc42 с образованием ламеллиподий и филоподий и трансформацией раннего контакта в фокальный комплекс, последний процесс характеризуется рекрутированием паксиллина, винкулина, при этом уровень винкулина коррелирует линейно с величиной силы [17].

Фокальные комплексы — предшественники сайтов фокальной адгезии. Последние представляют собой удлиненные структуры, образуемые при активации Rho: ее эффектор — Rho-киназа — фосфорилирует легкие цепи миозина, рост величины силы приводит к увеличению плотности интегрин, рекрутированию дополнительных структурных белков адгезии, удлинению сайта адгезии в направлении действующей силы [17]. Зоны ФА сравнительно недавно были изучены с применением микроскопии сверхвысокого разрешения — было установлено [18], что интегрин и актин в сайте ФА разделены по вертикали 40-нм коровым слоем, который в свою очередь состоит из многих слоев:

- «сигнального слоя» из цитоплазматических доменов интегрин, киназ фокальной адгезии, паксиллина;
- промежуточного слоя механической трансдукции из талина и винкулина;
- актин-регулирующего слоя из зиксина, фосфоротеина, стимулирующего вазодилатацию и альфа-актинина.

В целом, в формировании сайтов фокальной адгезии могут участвовать более 150 белков, обозначаемых вместе как адгезом [18].

Важную роль в перестройке функционирования клетки при действии сдвиговой деформации также играют другие интегрин-зависимые сигнальные пути, такие, как тесно связанный с Rho-опосредуемым путем FAK and c-Src сигнальные ветви, MAP-киназы, а также ERK, JNK, и NF κ B-опосредуемые сигнальные пути [17]. Кроме того, было показано, что сдвиговая деформация вызывает активацию рецептора фактора роста сосудов VEGF Flk-1 на поверхности эндотелиальных клеток, причем активация детектируется уже на 1-й мин, достигает пика на 10—15-й мин и возвращается к базовому уровню через 30 мин [19]. Тем не менее, хотя активация Flk-1 не зависит от собственных лигандов, блокирование интегринов деактивирует Flk-1 при сдвиговой деформации [20], что позволяет причислить Flk-1 к интегрин-зависимым путям.

Следует отметить, что в экспериментах по изучению сдвиговой деформации создаются силы порядка 1 Па, что примерно в 500 раз меньше, чем тянущие силы при адгезии и образовании ламелиподий [17]. Адгезивные контакты, как правило, составляют всего около 10% площади базальной поверхности, и, если сила эффективно и полностью передается на базальную поверхность, то в зонах ФА должно наблюдаться десятикратное увеличение действующей на клетку силы [17].

Несмотря на детальные исследования действия сдвиговой деформации на клетку, интенсивно проводимые со второй половины XX века и установление активируемых при СД сигнальных каскадов, вопрос о том, как осуществляется конверсия механического стимула в химический сигнал, оставался длительное время нерешенным. В 2009 году с использованием магнитных твизеров, микроскопии полного внутреннего отражения и атомной силовой микроскопии было установлено, что силы в диапазоне физиологических значений вызывают растягивание молекул талина, что открывает в них криптические сайты связывания винкулина — таким образом осуществляется механотрансдукция в зонах ФА [21].

Как было сказано выше, важную роль в перераспределении механических усилий играют межклеточные контакты: действительно, эндотелиальные клетки образуют единую ткань — эндотелий, который, как предполагается, представляет собой не просто сумму свойств клеток, а приобретает ряд дополнительных важных особенностей, обусловленных кооперативными эффектами клеток.

Логику функционирования ФА при сдвиговой деформации можно было бы перенести и на межклеточные контакты, однако, для последних есть ряд особенностей. Основными для соседних эндотелиальных клеток служат плотные, щелевые и адгерентные кон-

такты. Плотные контакты (ПК) выполняют барьерную функцию, управляя проницаемостью эндотелия, и, будучи непроницаемыми или малопроницаемыми для жидкости, регулируют диффузию ряда соединений, что важно для функционирования гемато-тканевых барьеров, в частности, гематоэнцефалического. Сдвиговая деформация модулирует экспрессию белков, участвующих в образовании ПК, что может способствовать, например, увеличению проницаемости эндотелия.

Адгерентные контакты чувствительны к большому диапазону действующих сил и играют значительную роль в механотрансдукции и перераспределении механической нагрузки на соседние клетки. Выше было отмечено сходство характера перестроений зон ФА с изменениями в клеточных контактах при действии механических сил на клетку — действительно, адгерентные соединения усиливаются в ответ на натяжение [22], при этом происходит увеличение плотности кадгерина и винкулина.

Специфичный для эндотелия кадгерин — VE-кадгерин (VE-cadherin) — через свой цитоплазматический домен связывается с β -катенином или γ -катенином, что, в свою очередь, рекрутирует в комплекс α -катенин — важный для механотрансдукции белок, способный взаимодействовать с рядом актин-связывающих белков, таких, как винкулин, α -актинин, афадин, формин, EPLIN, ZO-1 [23], при действии механических сил молекула α -катенина растягивается, демаскируя сайт связывания винкулина.

Еще одним важным механопреобразователем, относящимся к межклеточным контактам, является PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1), также известный как CD31 — гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, обильно представленный на поверхности эндотелиальных клеток. Для PECAM-1 лигандом выступает другая молекула PECAM-1 [24], за счет чего обеспечивается установление контактов между клетками. Однако лигандами PECAM-1 могут выступать и интегрин α v β 3, CD177 и ряд других молекул [24]. Цитоплазматическая часть PECAM-1 включает в себя 2 иммунорецепторных тирозиновых ингибиторных мотива, которые служат сайтами связывания тирозиновых фосфатаз. Тирозиновые и сериновые/треониновые остатки этих внутриклеточных областей PECAM-1 могут фосфорилироваться [24], кроме того, цитоплазматическая часть PECAM-1 связывается с β -катенином или γ -катенином [25], т.е. схожим с VE-кадгеринном способом может передавать усилие на цитоскелет.

В эндотелиальных клетках сдвиговая деформация приводит к фосфорилированию тирозинов PECAM-1, что способствует увеличению степени ассоциации PECAM-1 и эндотелиальной NO-синтазы eNOS

[26]. Фосфорилирование тирозинов PECAM-1 модулирует активацию Akt и eNOS [26]. Вообще, с началом действия сдвиговой деформации продукция NO возрастает в диапазоне от двух до четырехкратного превышения базального уровня и поддерживается на всем протяжении действия сдвиговой деформации, при этом в активации eNOS можно выделить две фазы: начальный Ca^{2+} -зависимый пик с последующим низким плато, которое уже не зависит от возрастающего уровня Ca^{2+} [26]. Вторая фаза роста продукции NO связана с фосфорилированием eNOS киназами Akt и PKA. При действии сдвиговой деформации степень физической ассоциации между PECAM-1 и eNOS не возрастает монотонно, а наблюдается похожая фазность: между 15-й и 60-й секундами действия сдвиговой деформации, т.е. в фазу кальций-зависимого роста продукции NO, наблюдается диссоциация, а затем, с 5-й до 60-й минуты — устойчивый рост связывания [26]. На наш взгляд, данный пример может иллюстрировать принцип интеграции информации в сигнальных системах клетки при действии сдвиговой деформации. Недавно с помощью разработанных биосенсоров на PECAM-1 и VE-кадгерин на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) было показано, что в статической культуре эндотелиальных клеток ВАЕС VE-кадгерин в составе межклеточных контактов находится под действием значительной силы натяжения, действующей со стороны миозина, при этом натяжение не было зафиксировано для молекул VE-кадгерина вне клеточных контактов [27]. Сдвиговая деформация вызывала быстрое (менее чем через 30 с) снижение силы натяжения VE-кадгерина, однако натяжение увеличивалось в комплексах PECAM-1, локализованных в местах межклеточных контактов, причем в статических условиях в них значимых сил не было зарегистрировано [27]. СД приводила также к увеличению связывания PECAM-1 и виментина, что согласуется с вышеуказанными работами, показавшими ассоциацию PECAM-1 и связывающих виментин белков, таких, как γ -катенин [27]. Таким образом, PECAM-1 и VE-кадгерин показали согласованную реакцию на сдвиговую деформацию, тем не менее, речь о полном сопряжении, по-видимому, не идет, так как нокдаун виментина блокировал рост силы на комплексах PECAM-1 при СД, но не влиял на изменения в VE-кадгерине [27]. Это сравнительно недавнее исследование подтверждает концепцию передачи усилия через цитоскелет на межклеточные контакты. Однако ставится под сомнение пассивный характер этой передачи: силы межклеточного и внутриклеточного натяжения в эндотелиальных клетках при действии ламинарного потока на порядок больше, чем необходимо для пассивного уравни-

вания сил сдвига [28]. Предполагается, что существует механосенсор выше цитоскелетных белков и белков контактов, низкоинтенсивный сигнал от этого сенсора может индуцировать перенос более мощного усилия миозина на PECAM-1, что будет способствовать усилению сигнала [27]. Помимо того, что схемы усиления сигналов часто встречаются в биохимических путях [27], разобщение передачи механических сил по цитоскелету с увеличением роли химических сигналов может способствовать, по-видимому, детектированию сдвиговой деформации в более широком диапазоне величин.

Механотрансдукция. Ионные каналы

В качестве прямых механосенсоров может выступать ряд других элементов эндотелия. Например, среди самых ранних событий, возникающих при действии СД, можно отметить активацию ионных каналов. Механочувствительные ионные каналы рассматриваются в качестве непосредственных сенсоров сдвиговой деформации; хотя эндотелиальные клетки не являются возбудимыми, не экспрессируют высокие уровни потенциалзависимых каналов и не отвечают распространением волны деполяризации или гиперполяризации, изменение ионного состава при действии сдвиговой деформации оказывает существенное действие на функции эндотелия [29]. Тем не менее, соседство эндотелиальных клеток с возбудимыми мышечными клетками, функционирование которых в значительной степени зависит от ионных каналов, затрудняет анализ прямых эффектов сдвиговой деформации на ионные каналы эндотелия.

Можно перечислить несколько ионов, «отвечающих» на действие сдвиговой деформации: кальций, калий, натрий, хлорид-ионы. Уже упоминавшиеся выше ионы кальция, поступающие из внеклеточной среды и из внутриклеточных депо, играют роль в активации eNOS и, соответственно, вазодилатации, а также других важных процессах, регулирующих состояние эндотелиальной клетки. Эндотелиальные клетки за счет щелевых контактов могут электрически сопрягаться с гладкомышечными клетками, что, предположительно, формирует дополнительную систему управления сокращением последних [29, 30]. С учетом частой вовлеченности кальция в сигнальные процессы в качестве вторичного мессенджера, установление первичного сенсорного звена, чувствительного к сдвиговой деформации и перекодирующего информацию о сдвиговом воздействии в изменения концентрации кальция, осложнено непрямыми эффектами. Однако, ввиду сложной динамики концентрации кальция в цитоплазме, существования «волн» кальциевой концентрации, этот катион представляется веро-

ятым посредником в рецепции эндотелиальными клетками сложных гидродинамических паттернов, например, осциллиаций потока.

Калий также предполагается важным катионом, участвующим в детектировании эндотелиальными клетками СД. Было показано, что экспрессируемый на высоком уровне эндотелиальными клетками калиевый канал Kir2.1 является компонентом раннего ответа на СД [31], и он может опосредовать возрастающий ток ионов калия. Однако в указанной работе использовался рекомбинантный белок Kir2.1, специфическое ингибирование ввиду отсутствия высокоспецифичных блокаторов не применялось [29], что затрудняет анализ прямых эффектов и взаимодействия с другими сигнальными путями.

Сравнительно недавно значительное внимание в связи с механорецепцией привлекли белки семейства Piezo. Белок Piezo-1 рассматривается в качестве первичного механочувствительного ионного канала, действие сдвиговой деформации на который сопряжено с его активацией [см. обзор 32].

Адаптация и клеточный стресс при сдвиговой деформации

«Острое» начало действия сдвиговой деформации влечет за собой последовательность процессов, происходящих в эндотелиальной клетке в различном временном масштабе. Ранними событиями в этой последовательности являются изменения ионного состава, опосредуемые ионными каналами; передача механической силы на различные части клетки, главным образом посредством цитоскелета. В качестве механосенсора может выступать весь цитоскелет эндотелиальной клетки с ассоциированными сигнальными каскадами, активирующимися в определенных «горячих» точках [26]. Эти сигнальные системы участвуют в трансдукции механической деформации и, по-видимому, формируют специфические для данного набора сил комбинации сигнальных молекул разной химической природы, транскрипционных факторов, кодируя информацию о сдвиговой деформации и передавая ее в ядро. Активирующаяся в ответ на это экспрессия генов формирует долговременные изменения в цитоскелете, направленные на адаптацию клетки к механической нагрузке. Следует отметить, что если на эндотелий действует ламинарный и однонаправленный поток, активность сигнальных систем возвращается через некоторое время к базовому уровню. Это может быть связано с десенситизацией активности механочувствительных ионных каналов, восстановлением низкого уровня цитоплазматического кальция в связи с обратным захватом во внутриклеточные депо или экспортом во внеклеточное пространство [5].

В местах сосудистого русла со сложной гидродинамикой в виде реверсивных течений, турбулентности не наблюдается падения активности сигнальных систем, ассоциированных со сдвиговой деформацией, что может приводить к индукции провоспалительных путей в эндотелии. В этих регионах эндотелий даже в норме может экспрессировать на низком уровне маркеры воспаления и более предрасположен к развитию атеросклероза — так, у здоровых свиней [33] обнаруживалась повышенная активация провоспалительного пути, опосредуемого транскрипционным фактором NFκB, а также снижение экспрессии синтазы оксида азота. Предполагается, что состояние эндотелия в подобных зонах нефизиологично [3], т.е. постоянная стимуляция сигнальных путей может формировать патологический сигнал. Эндотелий при этом оказывается более проницаемым для макромолекул, более доступным для адгезии моноцитов, также в нем более выражена пролиферация [3].

Эндотелий в зонах развития атеросклероза экспрессирует маркеры клеточного стресса, в частности, стресса эндоплазматического ретикулама. Так, в сформировавшихся очагах атеросклеротических поражений в сосудах регистрировали повышенную экспрессию шаперона GRP78 [34]. Высокая экспрессия этого шаперона, а также активация других путей клеточного стресса обнаруживалась в фиброзных бляшках и особенно их покрышках у аполипопротеин Е-дефицитной мыши с развившейся гипергомоцистеинемией [35]. Было высказано предположение [36], что фракция GRP78, локализованная на мембране эндотелиальных клеток, связывает и ингибирует тканевой фактор, что может выполнять защитную функцию при развитии атеросклероза. Однако, следует отметить, что клеточный стрессовый ответ вовлечен в развитие многих патологий в качестве первичной реакции клетки на нарушение гомеостаза в результате прямого действия патогена, и как вторично активируемый ответ в нефизиологических условиях. Экспрессия GRP78 была показана на всех стадиях развития атеросклероза, включая ранние, предшествующие накоплению холестерина [37]. Это указывает на то, что могут существовать условия, приводящие к развитию клеточного стресса (стресса ЭПР) до начала формирования повреждения, и специфические гидродинамические условия, по-видимому, могут рассматриваться в качестве них [37, 38]. В работе [38] у мышей была показана увеличенная экспрессия GRP78 в зоне внутренней части дуги аорты, а также у 8-недельных ApoE^{-/-} мышей в местах ответвления межреберных артерий — для всех этих зон характерны специфические гидродинамические условия, и они являются местами, наиболее подверженными развитию атеросклероза. Все это позволило предположить роль предрас-

полагающей к развитию атеросклероза сдвиговой деформации в индукции экспрессии маркеров стресса ЭГР [38]: по мнению авторов, низкая интенсивность сдвиговой деформации и нестабильное направление потока, возникающие в зонах ветвления сосудов или местах с выраженной нелинейной геометрией, способны индуцировать клеточный стресс. В данном *in vitro* исследовании использовались два профиля сдвиговой деформации:

- *атеропротективный* профиль воздействия — осциллирующая во времени СД в диапазоне 1—4 Па с пиком 4 Па, длящемся около 300 мс;
- *способствующий развитию атеросклероза* профиль — *низкая СД, осциллирующая в диапазоне от 0.2 Па и ниже.*

Согласно данным, представленным в работе [38], способствующая атеросклерозу СД приводила к стабильному росту уровня белка GRP78 по сравнению с атеропротективным профилем, где после краткосрочной 4-часовой фазы подъема его уровень возвращался к контрольным значениям. Причем уровень мРНК GRP78 при атеросклероз-ассоциированной СД после краткосрочного повышения снижался к 16 часам, как и в случае атеропротективной СД. Авторы предполагают преимущественную стабилизацию белка GRP78, но не мРНК при действии способствующей атеросклерозу СД. Увеличение уровня GRP78 зависело от СД-активируемой киназы p38, которая, в свою очередь, в существенной степени зависела от интегрин $\alpha 2\beta 1$ [38]. Авторы указывают, что опосредуемые интегринными антиапоптотические сигналы от внеклеточного матрикса модулируются шаперонами, к семейству которых принадлежит и GRP78.

В недавней работе [39] показано, что белок теплового шока 70 (heat shock protein 70, Hsp70) регулирует активацию $\alpha IIb\beta 3$ интегрин тромбоцитов, секрецию тромбоцитами гранул и агрегацию, а ингибирование тромбоцитарных белков Hsp70 блокирует агрегацию и секрецию в ответ на коллаген-ассоциированные пептиды (CRP). *Ex vivo* фармакологическое ингибирование Hsp70 в цельной крови предотвращает образование тромбоцитарных агрегатов на коллагене в потоке.

Нами с использованием микрофлюидной модели сосуда и эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 получены данные об увеличении экспрессии GRP78 в клетках в зонах с высокой интенсивностью сдвиговой деформации. Интересно, что в работе [38] высокий уровень GRP78 регистрировался в бляшке ApoE-/- мыши и особенно в ее покрышке. Бляшка суживает просвет сосуда, увеличивая величину сдвиговой деформации. Однако в этом случае нельзя исключать и вторично-обусловленного характера повышения экспрессии GRP78, т.е. участия в индукции стресса эндоплазматического ретикулаума других факторов.

Несмотря на накапливающиеся в последнее время данные об экспрессии в эндотелии генов стрессового ответа, таких, как шаперон GRP78, в участках сосудистого русла со сложной гидродинамикой, пока остаются неясными причины наблюдаемого роста экспрессии. Как было отмечено выше, передача механической деформации в эндотелии на цитоскелет с вовлечением межклеточных контактов, гликокаликса, фокальных адгезий включает в себя конформационные изменения белков, таких, как α -актинин или талин, а именно, частичное их разворачивание с экспонированием скрытых сайтов связывания для взаимодействующих с ними белков [21]. В целом, подобные «растяжения» белков играют важную роль в механотрансдукции [40, 41], может происходить даже разворачивание белков [42]. В начальный момент действия силы ее перераспределение по цитоскелету имеет неравномерный характер, и нельзя исключать того, что при конформационном переходе белка в «растянутое» состояние при превышении усилия может происходить разворачивание белка с потерей им нативной конформации. Это похоже на действие стрессорных факторов на эндотелий, таких, как температура или химические соединения [43]. Разворачиванию могут быть подвержены, вероятно, и экстраклеточные домены мембранных белков. В такой ситуации клетка может увеличивать синтез шаперонов для рефолдинга подобных белков. Кроме того, при адаптации к СД может происходить общий рост синтеза белка, что неизбежно потребует больше шаперонов и фолдаз для правильного сворачивания белков, в том числе их экстраклеточных частей. Интересно отметить, что ранее указанное несоответствие, а именно, существенное превышение сил, действующих в норме в цитоскелете над силами, передаваемыми в ходе механотрансдукции, может быть естественным фактором, защищающим клетку от подобного рода повреждений. Таким образом, увеличение экспрессии шаперонов при действии сдвиговой деформации, таких, как GRP78, по нашему мнению, носит цитопротективный характер и может играть важную роль в долгосрочной адаптации эндотелиальных клеток.

Модели для изучения сдвиговой деформации *in vitro*. Микрофлюидика

Необходимо отметить, что успехи в изучении механотрансдукции в эндотелии были бы невозможны без разработки эффективных клеточных моделей. Для исследования сдвиговой деформации активно применялся и был довольно успешен ряд устройств, например, конический вискозиметр и устройство с параллельными пластинами, которые значительно расширили наши представления о действии сдвиговой

деформации на клетки и позволили установить причины, определяющие анатомическую локализацию сосудистых заболеваний [44].

Сравнительно недавний прогресс в области микрофлюидики предоставил исследователям новые возможности. Микрофлюидные устройства обладают преимуществом по сравнению с традиционными системами в связи с тем, что в соответствии с законом Пуазейля сдвиговая деформация обратно пропорциональна кубу радиуса сечения круглого канала и прямо пропорциональна объемной скорости, поэтому в микромасштабе возможно достижение больших величин сдвиговой деформации при сравнительно низких волюметрических значениях. Так, при уменьшении радиуса канала устройства для моделирования СД в 10 раз, объемная скорость может быть уменьшена в 1000 раз с сохранением той же величины СД.

Для сосудистой системы характерен сравнительно широкий диапазон величин сдвиговой деформации: средняя величина в артериолах и капиллярах составляет 4—6 Па, но в более крупных артериях и венах она ниже и находится в диапазоне 1—2 Па. Тем не менее, в короткие периоды времени во время систолы сдвиговая деформация в артериях может достигать 20 Па. Минимизация объемной скорости имеет существенное значение для долгосрочных экспериментов. Нами разработана микрофлюидная система [45], в которой сдвиговая деформация 4 Па может поддерживаться длительное время — сутки и более — что важно для сравнительно продолжительного процесса адаптации эндотелиоцитов к сдвиговой деформации. Снижение объемных скоростей приводит к существенному сокращению количества требуемых реагентов, что удешевляет долгосрочные эксперименты. Нами применена в разработанной системе схема возврата рабочей жидкости (ростовой среды), что дает возможность использования почти не ограниченного по времени воздействия на эндотелиальные клетки СД в широком диапазоне, включая сверхвысокие значения.

К преимуществам микрофлюидных устройств относится также возможность и сравнительная легкость одновременного исследования нескольких средних значений сдвиговой деформации, например, в работе [46] исследовался диапазон 0,07—13 Па с использованием параллельных камер. В другом исследовании при использовании градиента сдвиговой деформации было показано, что индуцированная фактором некроза опухоли альфа (TNF α) экспрессия молекул адгезии VCAM-1 и E-selectin эндотелием сохраняется повышенной при низких значениях сдвиговой деформации (0,2—0,4 Па) и снижается при значениях СД более 0,8 Па [47]. Авторами показана более интенсивная адгезия моноцитов к областям с более низкой сдвиговой деформацией.

В литературе обсуждается довольно много подходов по биомоделированию микрососудов *in vitro*. Работы по поддержанию гистотипической культуры клеток *in vitro* начались сравнительно давно [48] и, фактически, с тех пор свойство эндотелиальных клеток самоорганизовываться в 2D культуре и в 3D матриксах активно используется в различных приложениях. Однако, биология эндотелиальных клеток зависит от взаимодействия с потоком, поэтому, актуальной задачей для более адекватного моделирования сосудов стала разработка методов перфузии капиллярно-подобных эндотелиальных структур *in vitro*.

Перфузия начала активно применяться уже в ранних работах, среди которых следует упомянуть интересное биомоделирование сосуда на основе полимеризованного в цилиндрической форме с добавлением гладкомышечных клеток коллагена, дополнительно укрепленного полимерной сеткой (полиэстер, Dacron) и засеянного эндотелиальными клетками бычьей аорты [49]. Эта модель была одним из первых успешных приближений мышечной артерии *in vitro*, в которой эндотелий сохранял свои функциональные свойства — синтезировал фактор Виллебранда, простаглицлин, формировал барьер проницаемости для крупных молекул, таких, как альбумин. В отсутствие полимерной сетки даже небольшие давления (менее 10 мм рт. ст.) приводили к разрыву сосуда, однако, с добавлением сетки, слоев коллагена и увеличением его концентрации удавалось достичь физиологических величин давления. Следует отметить, что создание такой модели весьма трудоемко и времязатратно (несколько недель), кроме того, имитации ветвления сосуда с помощью такого подхода сложно реализовать.

Для решения задачи создания перфузируемого микрососуда весьма эффективным является подход мягкой литографии, который сравнительно легко позволяет получить множественные полимерные реплики с твердой подложки с нанесенными на нее предварительно спроектированными структурами — полостями, каналами — и впоследствии подключить связанные пространства внутри чипа к жидкостным насосам различного принципа действия (шприцевые, перистальтические и др.). Интересным применением мягкой литографии является работа [50], в которой в силиконовый квадратный канал реплики сначала помещали иглу (диаметр 120 мкм, длина 15 мм), покрытую альбумином, и затем вводили раствор коллагена (коллаген тип I), который полимеризовался. После этого иглу удаляли, что формировало круглый в сечении канал в коллагеновом геле. Далее канал заполняли суспензией клеток HUVEC (10 млн/мл), плотность которой была увеличена за счет добавления декстрана 70 кДа до конечной концентрации 4%, что позволяло лучше контролировать посадочную плотность клеток. Таким об-

разом, формировался слой эндотелиальных клеток. Неадгезировавшие клетки удаляли путем включения тока среды со скоростью 3 мкл/мин через 5 мин после посадки клеток. Авторы использовали клеточные плотности, формировавшие не более 50% конфлюентности, так как в противном случае наблюдалась деформация коллагена и инвазия эндотелиальных клеток. Такое моделирование позволяло проводить прижизненные микроскопические наблюдения и оценку функциональных свойств эндотелия, включая его проницаемость. Авторы сообщают, что несмотря на отличия их системы с микрососудами *in vivo*, полученные «эндотелиальные конструкции» достаточно хорошо воспроизводят ряд функций и гидродинамические условия, характерные для больших венул. Конечный диаметр моделированных сосудов составлял 75—150 мкм. Авторы применяли величину сдвиговой деформации, характерную для венул и находившуюся в диапазоне 10—40 дин/см², т.е. 1—4 Па на основе расчетных значений, исходя из величины объемной скорости. Считается, что эндотелиальные трубки подобного диаметра могут выступать в качестве модели так называемых «гигантских» капилляров, которые наблюдаются в опухолях или очагах хронического воспаления.

Заключение

На настоящий момент накоплено значительное количество данных о механизмах механотрансдукции в эндотелии. Однако наше понимание этих процессов все еще остается неполным. Благодаря стремительно развивающимся биомедицинским технологиям, таким, как микрофлюидика, функциональная геномика, в ближайшее время следует ожидать дальнейшего и существенного роста наших знаний о функционировании эндотелия при действии механических сил.

References

1. Chien S (2007) Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 292: H1209-H1224.
2. Hahn C, Schwartz MA (2009) Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 10: 53-62.
3. Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular research*: cvt101.
4. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 10: 21.
5. Davies PF (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological reviews*, 75: 519-60.
6. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER (2007) The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9: 121-67.

7. Vink H, Duling BR (1996) Identification of Distinct Luminal Domains for Macromolecules, Erythrocytes, and Leukocytes Within Mammalian Capillaries. *Circulation Research*. 79: 581-9. Available: <http://circres.ahajournals.org/content/79/3/581>.
8. Feng J, Weinbaum S (2000) Lubrication theory in highly compressible porous media: the mechanics of skiing, from red cells to humans. *Journal of Fluid Mechanics*. 422: 281-317.
9. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, et al. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry*. 68: 729-77.
10. Liebersbach BF, Sanderson RD (1994) Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 20013-9.
11. Squire JM, Chew M, Nneji G, Neal C, Barry J, et al. (2001) Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *Journal of structural biology*. 136: 239-55.
12. Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC (2004) The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a «bumper-car» model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 16483-8.
13. Zeng Y, Tarbell JM (2014) The adaptive remodeling of endothelial glycocalyx in response to fluid shear stress. *PloS one*. 9: e86249.
14. Tzima E, Del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA (2001) Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO journal*. 20: 4639-47.
15. Ren X-D, Kiosses WB, Schwartz MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO journal*. 18: 578-85.
16. Davies PF, Robotewskyj A, Griem ML (1994) Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *Journal of Clinical Investigation*. 93: 2031.
17. Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA (2004) Integrins in mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 12001-4.
18. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, et al. (2010) Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*. 468: 580-84.
19. Li Y-SJ, Haga JH, Chien S (2005) Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of biomechanics*. 38: 1949-71.
20. Wang Y, Miao H, Li S, Chen K-D, Li Y-S, et al. (2002) Interplay between integrins and FLK-1 in shear stress-induced signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 283: C1540-C7.
21. Del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, et al. (2009) Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 323: 638-41.
22. Liu Z, Tan JL, Cohen DM, Yang MT, Sniadecki NJ, et al. (2010) Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 9944-9.
23. Gulino-Debrac D (2013) Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function. *Tissue barriers*. 1: e24180.
24. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 27: 2514-2523.
25. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejama E, Schultz DA, et al. (2005) A mechanosensory complex that

mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*.437: 426-431.

26. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R (2005) Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *Journal of cell science*. 118: 4103-11.

27. Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS, et al. (2013) Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology*. 23: 1024-30.

28. Hur SS, Del Alamo JC, Park JS, Li Y-S, Nguyen HA, et al. (2012) Roles of cell confluency and fluid shear in 3-dimensional intracellular forces in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 11110-5.

29. Gerhold KA, Schwartz MA (2016) Ion Channels in Endothelial Responses to Fluid Shear Stress. *Physiology*. 31: 359-69.

30. Griffith TM (2004) Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *British journal of pharmacology*. 141: 881-903.

31. Hoger JH, Ilyin VI, Forsyth S, Hoger A (2002) Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 7780-5.

32. Wu J, Lewis AH, Grandl J (2017) Touch, Tension, and Transduction-The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends in biochemical sciences*. 42: 57-71.

33. Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA (2001) Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 4478-85.

34. Liu C, Bhattacharjee G, Boisvert W, Dilley R, Edgington T (2003) In vivo interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces. *The American journal of pathology*. 163: 1859-71.

35. Zhou J, Werstuck GH, Lhotak/vSarka, de Koning AL, Sood SK, et al. (2004) Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 110: 207-13.

36. Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, El-Sheikh A, Mackman N, et al. (2005) Regulation of tissue factor-mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 25: 1737-43.

37. Zhou J, Lhotak/vSarka, Hilditch BA, Austin RC (2005) Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 111: 1814-21.

38. Feaver RE, Hastings NE, Pryor A, Blackman BR (2008) GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, α - β -dependent mechanism in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 28: 1534-41.

39. Rigg RA, Healy LD, Nowak MS, Mallet J, Thierheimer ML, et al. (2016) Heat shock protein 70 regulates platelet integrin activation, granule secretion and aggregation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 310: C568-C75.

40. Mitrea DM, Kriwacki RW (2013) Regulated unfolding of proteins in signaling. *FEBS letters*. 587: 1081-8.

41. Vogel V (2006) Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 35: 459-88.

42. Bao G, Kamm RD, Thomas W, Hwang W, Fletcher DA, et al. (2010) Molecular biomechanics: the molecular basis of how forces regulate cellular function. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 3: 91-105.

43. Ignashkova T, Mesitov M, Rybakov A, Moskovtsev A, Sokolovskaia A, et al. Deposition of von Willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine in vitro. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; 3: 81-6. (in Russian)

44. Chiu J-J, Chien S (2011) Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological reviews*. 91: 327-87.

45. Kolesov D, Moskovtsev A, Mylnikova AN, Savina G, Sokolovskaya A, et al. (2016) Biomodeling of microvessels in a microfluidic chip. *Pathogenesis*. 14: 4-8.

46. Chau L, Doran M, Cooper-White J (2009) A novel multishear microdevice for studying cell mechanics. *Lab on a Chip*. 9: 1897-902.

47. Tsou JK, Gower RM, Ting HJ, Schaff UY, Inzana MF, et al. (2008) Spatial regulation of inflammation by human aortic endothelial cells in a linear gradient of shear stress. *Microcirculation*. 15: 311-23.

48. Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR (1979) Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76: 5217-21.

49. Weinberg CB, Bell E (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 231: 397-400.

50. Chrobak KM, Potter DR, Tien J (2006) Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro. *Microvascular research*. 71: 185-96.

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч.сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru

Колесов Дмитрий Валерьевич, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: maedros@bk.ru

Мьльникова Алёна Николаевна, аспирантка РХТУ им. Д.И. Менделеева

Зайченко Данила Михайлович, мл.науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: danilamihailovich@mail.ru

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИОПП»

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, академик РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России