

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ НА МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МИКРОКАНАЛАХ: ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

М. К. Максимов^{1*}, П. Б. Ермолинский¹, А. Н. Семенов¹, О. Н. Щегловитова², А. Е. Луговцов¹,
А. В. Приезжев¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1

*E-mail: madoway@yandex.ru

²НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия
123098, Российская Федерация, Москва, ул. Гамалеи, д. 18

В данной работе оптическими методами *in vitro* исследовалось межклеточное взаимодействие эритроцитов и эндотелиоцитов. С помощью лазерного пинцета были измерены силы адгезии эритроцитов к эндотелию, а также силы агрегации эритроцитов при добавлении в плазму крови или цельную кровь различных соединений (L-Аргинин, L-NAME), воздействующих на взаимодействие данных клеток. Методом лазерной агрегометрии была исследована агрегация эритроцитов в потоке крови в присутствии эндотелиальных клеток. Результаты демонстрируют снижение сил агрегации эритроцитов в присутствии эндотелия при стимуляции выделения оксида азота. В потоке агрегация эритроцитов также снижается в присутствии клеток эндотелия. Силы адгезии эритроцитов к эндотелию не изменяются или незначительно снижаются (в некоторых случаях) при увеличении концентрации оксида азота.

Течение крови в терминальных капиллярах определяется комплексом параметров, называемых микрореологическими. В первую очередь это параметры эритроцитов, наиболее многочисленных клеток крови, в частности – их деформируемость и способность к агрегации. Также решающую роль играет вязкость плазмы крови и параметры эндотелиоцитов - клеток, выстилающих сосуды изнутри. Патологические изменения упомянутых параметров приводят к нарушению насыщения тканей кислородом, повышенному тромбообразованию и другим негативным последствиям [1]. Например, при серповидно-клеточной анемии наблюдается значительное усиление адгезии эритроцитов к клеткам эндотелия, а при артериальной гипертензии – увеличение агрегации эритроцитов, то есть их адгезии друг к другу [2,3]. Межклеточное взаимодействие при кровообращении не ограничивается непосредственным механическим контактом между клетками, но также включает в себя межклеточную сигнализацию, то есть передачу сигналов посредством особых молекул-посредников. Так, эндотелиоциты являются основным источником оксида азота в кровотоке, увеличивающего деформируемость эритроцитов и снижающего их способность к агрегации [4].

Лазерный пинцет – установка, позволяющая с помощью сильно сфокусированного лазерного пучка захватывать диэлектрические частицы и манипулировать ими. Благодаря этому возможно измерение сил межклеточного взаимодействия. В данной работе был использован двухканальный лазерный пинцет на основе Nd:YAG лазера (1064 нм) [5]. Данный метод был применён при измерении сил взаимодействия двух эритроцитов, а также сил взаимодействия одного эритроцита и монослоя эндотелиальных клеток. Под силой агрегации понимается минимальная сила, необходимая для предотвращения агрегации пары частично перекрывающихся эритроцитов, под силой дезагрегации понимается минимальная сила, необходимая для разъединения такой пары. В целях минимизации погрешностей, вызванных индивидуальными особенностями клеток и доноров, данные были нормированы на среднее значение контроля для каждого донора.

В данной работе был использован лазерный агрегометр эритроцитов RheoScan-AnD300 (RheoMediTech, Корея). Лазерный пучок падает на кювету, заполненную цельной кровью, в микроканале которой создаётся поток. Детектируется интенсивность света, рассеянного назад. Чем меньше размер рассеивающих частиц (агрегатов эритроцитов) и их число, тем выше детектируемый сигнал. Разница давлений между концами микроканала кюветы монотонно снижается с течением времени измерения (1-2 мину-

ты), и в определённый момент времени наблюдается динамическое равновесие между процессами агрегации и дезагрегации эритроцитов. Сдвиговое напряжение в кювете, рассчитываемое для этого момента, называется критическим сдвиговым напряжением. Данный параметр характеризует гидродинамическую прочность агрегатов.

Результаты экспериментов, выполненных с лазерным пинцетом, свидетельствуют о снижении сил агрегации и дезагрегации эритроцитов в присутствии эндотелия, проинкубированного с L-Аргинином. L-Аргинин является субстратом фермента синтазы оксида азота, присутствующего в эндотелии. Соответственно, добавление данного соединения к эндотелию стимулирует увеличение выработки оксида азота, чем и объясняется снижение агрегации эритроцитов. В пользу данной гипотезы свидетельствует исчезновение эффекта при предварительной инкубации эндотелия с ингибитором данного фермента, L-NAME. Зависимость величины эффекта от концентрации L-Аргинина имеет “колоколообразную” зависимость: максимальное снижение сил наблюдается при концентрации 100 мкМ, дальнейшее увеличение концентрации приводит к увеличению сил вплоть до возвращения значений к контрольным при 1000 мкМ (рис. 1).

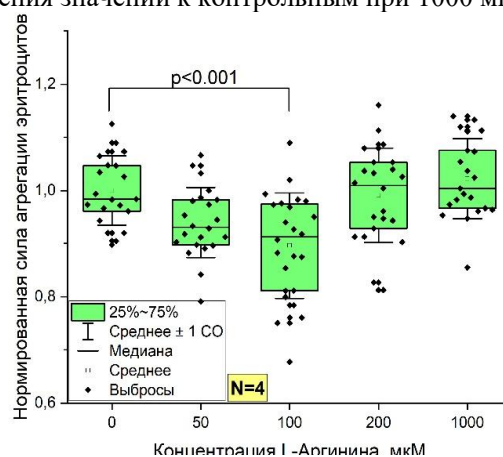


Рис. 1. Зависимость нормированной силы агрегации эритроцитов от концентрации L-Аргинина.

Мы считаем, что подобная зависимость возникает из-за ингибирования синтазы оксида азота своим продуктом при высоких концентрациях, что в физиологических условиях предотвращает цитотоксический эффект высоких концентраций оксида азота. Результаты экспериментов, выполненных с лазерным агрегометром, свидетельствуют о снижении критического сдвигового напряжения при добавлении суспензии эндотелиальных клеток в цельную кровь. Также данный параметр снижен в кюветах, покрытых монослоем эндотелиальных клеток. Это свидетельствует о снижении гидродинамической прочности агрегатов под воздействием клеток эндотелия. Вызван ли эффект конкретно оксидом азота, как в случае с L-Аргинином, ещё предстоит выяснить.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00120.

Список литературы

1. D. De Backer et.al. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy // *Ann Intensive Care*, vol. 1, № 1, p. 27, 2011.
2. J.-L. Wautier, M.-P. Wautier, Cellular and molecular aspects of blood cell-endothelium interactions in vascular disorders // *Int J Mol Sci*, vol. 21, № 15, p. 5315, 2020.
3. P. Ermolinskiy et.al. Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers // *J Biomed Photonics Eng*, vol. 4, № 3, p. 030303, 2018.
4. A.V. Muravyov, The role of gaseous mediators (CO, NO and H₂S) in the regulation of blood circulation: analysis of the participation of blood cell microrheology // *Regional Blood Circulation and Microcirculation*, vol. 20, № 1, pp. 91-99, 2021 (in Russian).
5. A.Y. Maklygin et al. Measurement of interaction forces between red blood cells in aggregates by optical tweezers // *Quantum Electron*, vol. 42, № 6, pp. 500-504, 2012.