

УДК 577.31

***ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СИНХРОНИЗАЦИЮ ОСЦИЛЛЯЦИЙ
КАЛЬЦИЯ И ОКСИДА АЗОТА В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ IN VITRO***

Серов Д.А.*кандидат биологических наук, научный сотрудник**Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук,
Россия, г. Москва.****Сизов Л.Р.****кандидат биологических наук, инженер**Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук,
Россия, г. Москва.***Аннотация**

Воздействие гипоксии на микроциркуляцию известно как один из механизмов патогенеза при различных заболеваниях. С эндотелиальным ритмом микроциркуляции связаны автоколебания в эндотелиоцитах концентрации ионов кальция Ca^{2+} и оксида азота NO. В данной работе на примере выделенной из мышечной культуры эндотелиоцитов было проведено исследование влияния модельной гипоксии на амплитудно-частотные характеристики осцилляций Ca^{2+} и NO и степень синхронизации данных осцилляций между клетками. В результате было обнаружено, что гипоксия в два раза снижает амплитуду низкочастотных (0,005–0,01 Гц) колебаний концентрации NO в эндотелиоцитах и в четыре раза снижает долю клеток с синхронизацией по колебаниям NO. Хотя гипоксия не оказывает влияния на амплитуду колебаний концентрации Ca^{2+} , она в 4,4 раза снижает степень синхронизации эндотелиоцитов по данным колебаниям, что указывает на различные механизмы, регулирующие кальциевые автоколебания и синхронизацию этих автоколебаний между клетками.

Ключевые слова: эндотелиоциты, гипоксия, осцилляция, ионы кальция, оксид азота, синхронизация клеток, микроциркуляция.

***THE EFFECT OF HYPOXIA ON THE SYNCHRONIZATION OF
CALCIUM AND NITRIC OXIDE OSCILLATIONS IN ENDOTHELIOCYTES IN
VITRO***

Serov D.A.

PhD in biology, researcher

*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Moscow*

Sizov L.R.

PhD in biology, engineer

*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Moscow*

Abstract

The effect of hypoxia on microcirculation is known as one of the mechanisms of pathogenesis of various diseases. The endothelial rhythm of microcirculation is associated with calcium Ca^{2+} and nitric oxide NO self-oscillations in endotheliocytes. This work has studied the effect of model hypoxia on the amplitude-frequency characteristics of Ca^{2+} and NO oscillations and the cell synchronization of these oscillations, using the example of an endotheliocyte culture isolated from mice. It was found that hypoxia reduces the amplitude of low-frequency (0.005-0.01 Hz) NO concentration fluctuations in endotheliocytes by two times and the proportion of synchronized cells by NO oscillations by four times. Although hypoxia does not affect the amplitude of Ca^{2+} oscillations, it reduces the degree of synchronization of endotheliocytes by 4.4 times according to these fluctuations, which indicates various

mechanisms regulating Ca^{2+} oscillations and the synchronization of these self-oscillations between cells.

Key words: endotheliocytes, hypoxia, oscillation, calcium ions, nitric oxide, cell synchronization, microcirculation.

Введение. Понятие «микроциркуляция» (или «микрогемодинамика») относится к процессу транспорта крови по сосудам с диаметром менее ~150 мкм [1]. Современные исследования микрогемодинамики выявляют наличие пяти ритмических компонент у человека, каждая из которых характеризуется определённым частотным диапазоном: 0,6-2,3 Гц (кардиоритм, С), 0,2-0,6 Гц (респираторный ритм, R), 0,05-0,2 Гц (миогенный ритм, M), 0,018-0,05 Гц (нейрогенный ритм, N) и 0,005-0,018 Гц (метаболический или эндотелиальный ритм) [2]. Эндотелиальный ритм с самыми низкими частотами является наименее исследованным в контексте физиологических механизмов, его связывают с метаболическими процессами регуляции микроциркуляторного кровотока, воздействующими и на обмен веществ, и на транспортную функцию крови [3].

С эндотелиальным ритмом связаны колебания концентрации в эндотелиоцитах микрососудов вазодилатирующего агента оксида азота NO, происходящими с участием ацетилхолина в качестве мессенджера [4] или при сдвиговом напряжении [5]. Также с колебаниями NO и с микроциркуляцией в диапазоне частот эндотелиального ритма могут быть связаны колебания внутриклеточной концентрации ионов кальция Ca^{2+} в эндотелиоцитах с частотой 0,005-0,01 Гц [6, 7].

В основном, исследования колебаний Ca^{2+} и NO проводят на тканевом уровне, но для уточнения механизмов регуляции микроциркуляции на клеточном уровне, например определения внутриклеточных посредников, участвующих в генерации колебаний в эндотелиальном ритме, отдельный интерес представляет изучение амплитудно-частотных характеристик (АЧХ)

колебаний Ca^{2+} и NO в отдельных эндотелиоцитах, а также степени синхронизации между этими отдельными клетками колебаний Ca^{2+} или NO.

Воздействие гипоксии на эндотелиальный ритм микроциркуляции известно как один из механизмов патогенеза при хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме, а также развитие индуцированного гипоксией функциональном состоянии эндотелиоцитов происходит и при других заболеваниях [8]. Гипоксия приводит к изменению экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и развитию эндотелиальной дисфункции [9].

Таким образом, в данной работе было проведено исследование влияния модельной гипоксии на колебания концентрации Ca^{2+} и NO в клетках культуры эндотелиоцитов как источника низкочастотных колебаний микроциркуляции и степень синхронизации этих колебаний между клетками.

Методы. Осцилляция Ca^{2+} и NO в эндотелиоцитах и её синхронизация между отдельными клетками изучалась методом флуоресцентной микроскопии культуры эндотелиоцитов из микрососудов легких и сердца мыши.

Для выделения эндотелиоцитов из микрососудов легочной ткани и сердца у мышей-самцов линии BALB использовали известный метод прямой магнитной сепарации с применением моноклональных антител к CD31 (PECAM-1) и ICAM-2 [10] с незначительными модификациями.

Моделирование гипоксических условий *in vitro* осуществляли путем 24-часовой инкубации клеток с 100 мкМ хлоридом кобальта (CoCl_2 [11]).

Флуоресцентную микроскопию культур проводили при температуре 37 °C. Внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} оценивали при помощи двухволнового кальций-чувствительного флуоресцентного зонда Fura-2 AM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, США), по соотношению сигналов флуоресценции при возбуждении на длинах волн 340 и 380 нм с предварительным вычитанием фоновых значений. Внутриклеточную концентрацию NO оценивали при помощи флуоресцентного зонда на DAF-FM (Molecular Probes, Thermo Fisher). Дневник науки | www.dnevnika.ru | СМЭ ЭЛ № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

Scientific, США) по сигналу флуоресценции при возбуждении на длине волны 490 нм. Регистрация динамических сигналов осуществлялась при последовательном использовании длин волн возбуждения 340, 380 и 490 нм с записью 2 кадра в секунду. Поскольку DAF-FM реагирует с NO необратимо, то количественную оценку колебаний внутриклеточной концентрации NO проводили путем измерения скорости накопления флуоресцентного сигнала, что отражает скорость синтеза NO в реальном времени [12].

Полученные временные ряды изменения Ca^{2+} и NO подвергали спектральному анализу с помощью непрерывного комплексного вейвлет-преобразования с материнским вейвлетом Морле. Для оценки синхронизации колебаний Ca^{2+} или NO в выбранной паре клеток на поле зрения с 100-200 клеток применяли комплексный подход, включающий оценку фазовой когерентности (ρ) и корреляции (R). Синхронизованными пары сигналов считались при $\rho > 0,5$ и $R > 0,5$. Значения усреднённой доли клеток с синхронизированными колебаниями сравнивались по критерию Манна-Уитни.

Более подробное описание применённых материалов, методологии и расчётов опубликовано в работе Astashev et al. [13].

Результаты и обсуждение. В клетках эндотелия были выявлены спонтанные колебания внутриклеточных концентраций Ca^{2+} и NO с частотой ниже 0,02 Гц.

Количественный анализ выявил значительную вариабельность в спонтанной осцилляторной активности эндотелиоцитов в пределах одной культуры. Доля клеток, демонстрирующих автоколебания концентрации Ca^{2+} , составила 26 (13–54)%. Полученная гетерогенность согласуется с литературными данными для эндотелиоцитов *Danio rerio* в процессе ангиогенеза [14]. В то же время, доля клеток со спонтанными колебаниями уровня NO оказалась существенно ниже и составила 6 (4–10)%. Этот результат указывает на существование дополнительного уровня гетерогенности и позволяет предположить, что для большинства эндотелиоцитов *in vitro*

характерны осцилляции исключительно Ca^{2+} NO не

Воздействие модельной гипоксии не оказало статистически значимого влияния на амплитудно-частотные характеристики (АЧХ) колебаний внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , тогда как для автоколебаний NO гипоксические условия привели к снижению нормированной амплитуды колебаний в низкочастотном диапазоне 0,005–0,01 Гц: с 1,1 (0,8–1,2) до 0,5 (0,4–0,6) (рис. 1Б). В частотном диапазоне 0,01–0,2 Гц статистически значимых изменений АЧХ колебаний NO под влиянием гипоксии зафиксировано не было.

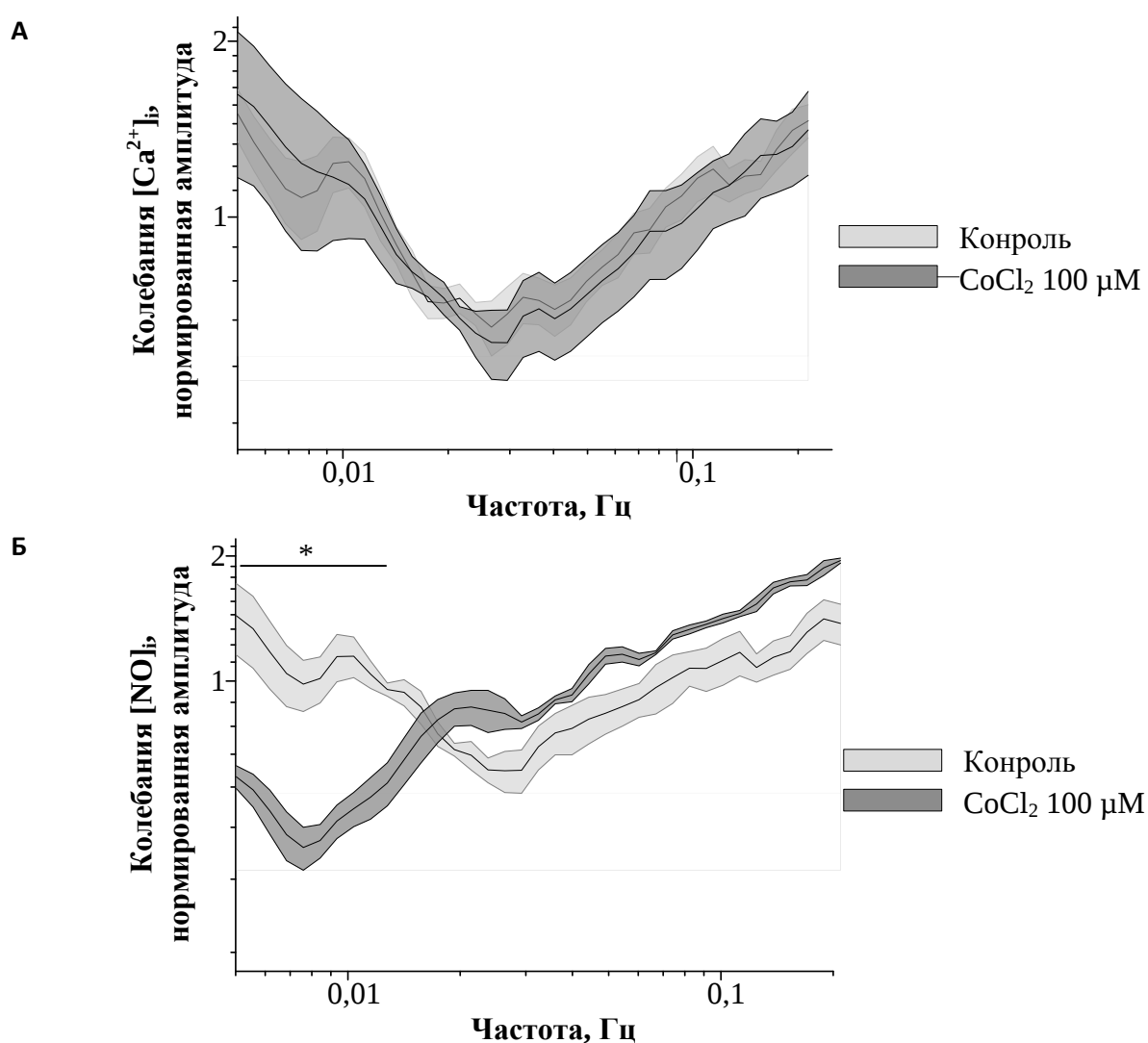
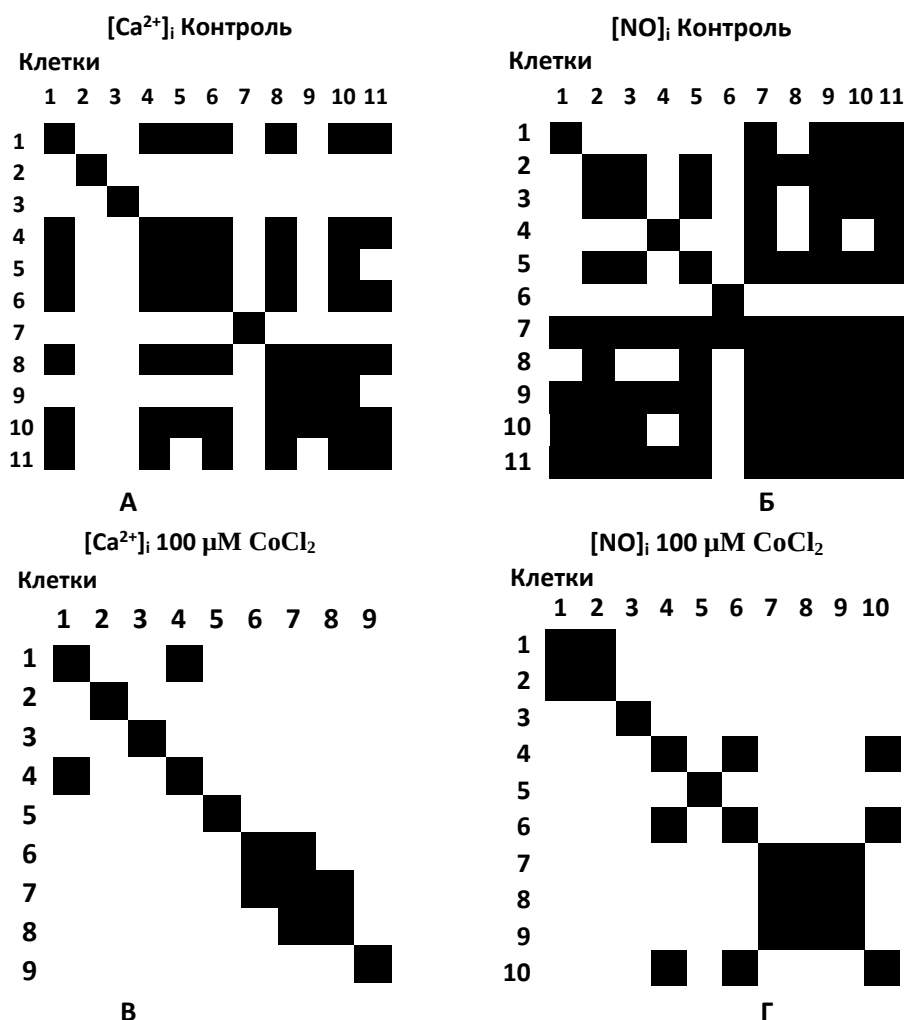


Рис. 1 – Усреднённые амплитудно-частотные характеристики колебаний кальция (А) и оксида азота (Б) в эндотелиоцитах в контроле (светло серые) и после индукции гипоксии (темно серые) 24 ч инкубацией с 100 мкМ CoCl_2 . Данные представлены в виде средних значений $\pm$

стандартная ошибка. * – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни ($n=3$). n – число проанализированных культур клеток. В каждой культуре анализировали 100-200 клеток.

Результаты оценки синхронизации клеток по колебаниям концентрации Ca^{2+} и NO представлены на рисунке 2Д. В контроле присутствовало ~45% и ~65% клеток, синхронизованных по колебаниям Ca^{2+} (рис. 2А) и NO (рис. 2Б) соответственно. Индукция гипоксии снижала число синхронизованных клеток по колебаниям Ca^{2+} в 4,4 раза по сравнению с контролем (с ~40% до ~9%) (рис. 2В). В случае колебаний NO наблюдался сходный эффект: снижение составило 4,1 раза (с ~65% до 16%) (рис. 2Г).



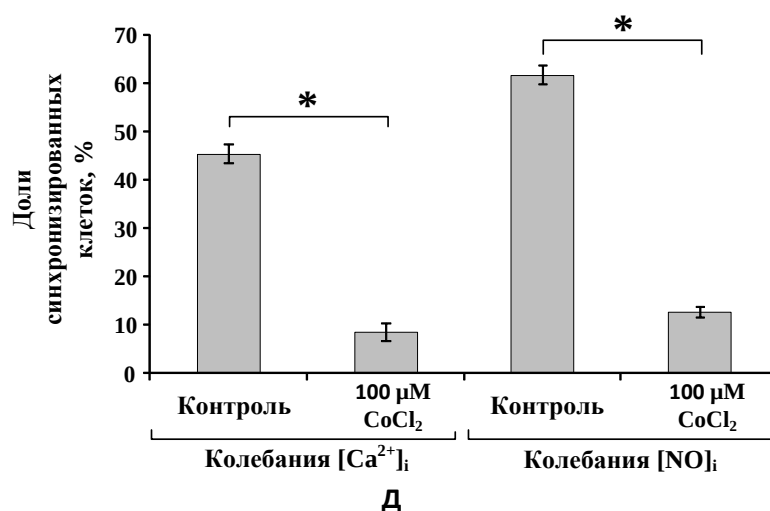


Рис. 2 – Матрицы синхронизации в паре эндотелиоцитов колебаний Ca^{2+} при нормоксии (А) и гипоксии (100 мкМ $CoCl_2$) (В) или колебаний NO при нормоксии (Б) и гипоксии (Г), чёрными квадратами обозначены пары клеток с синхронизованными колебаниями. Усредненная доля клеток с синхронизированными колебаниями Ca^{2+} или NO при нормоксии или гипоксии (Д), достоверно значимое различие средних * при $p < 0,05$.

Примечательно, что гипоксия не оказывала влияния на АЧХ колебаний Ca^{2+} , но снижала степень синхронизации. Это указывает на наличие в клетке нескольких мишеней для гипоксического воздействия, одни из которых отвечают за автономную генерацию колебаний кальция, а другие – за их синхронизацию между клетками. Петлями-генераторами могут выступать замкнутые циклы с участием рианодиновых рецепторов, eNOS и кальмодулинов [15-19]. Петлями-синхронизаторами могут выступать сигнальные пути, включающие диффузию NO, ацетилхолиновый и эндотеллин-зависимый пути [16, 18, 20-23]. Возможность действия гипоксии на секрецию эндотеллина и ацетилхолина описана в литературе [24, 25], что подтверждает принципиальную возможность реализации описанных моделей.

Таким образом, в данной работе показано, что гипоксия в два раза снижает амплитуду низкочастотных (0,005–0,01 Гц) колебаний концентрации NO в эндотелиоцитах и в четыре раза снижает долю клеток с синхронизацией по колебаниям NO. Хотя гипоксия не оказывает влияния на амплитуду колебаний концентрации Ca^{2+} , она в 4,4 раза снижает степень синхронизации

эндотелиоцитов по данным колебаниям, что указывает на различные механизмы, регулирующие кальциевые автоколебания и синхронизацию этих автоколебаний между клетками. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов влияния гипоксии при различных патологиях на функцию эндотелия сосудов по регуляции микроциркуляции.

Библиографический список:

1. Guven, G. Microcirculation: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Application / G. Guven, M. P. Hilty, C. Ince // Blood Purification. – 2019. – Vol. 49. – № 1-2. – P. 143-150.
2. Tikhonova, I. V. Time–amplitude analysis of skin blood flow oscillations during the post-occlusive reactive hyperemia in human / I. V Tikhonova, A. V Tankanag, N. K. Chemeris // Microvascular Research. – 2010. – Vol. 80. – № 1. – P. 58-64.
3. In-vivo correlations between skin metabolic oscillations and vasomotion in wild-type mice and in a model of oxidative stress / S. Smirni, A. D. McNeilly, M. P. MacDonald [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 186.
4. Noninvasive Measure of Microvascular Nitric Oxide Function in Humans Using Very Low-Frequency Cutaneous Laser Doppler Flow Spectra / J. M. Stewart, I. Taneja, M. S. Goligorsky, M. S. Medow // Microcirculation. – 2007. – Vol. 14. – № 3. – P. 169-180.
5. Shear-Induced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells / K. Sriram, J. G. Laughlin, P. Rangamani, D. M. Tartakovsky // Biophysical Journal. – 2016. – Vol. 111. – № 1. – P. 208-221.
6. Endothelial Ca^{2+} oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo / Y. Yokota, H. Nakajima, Y. Wakayama [et al.] // eLife. – 2015. – Vol. 4. – P. e08817.
7. Busse, R. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin / R. Busse, A. Mülsch // FEBS Letters. – 1990. – Vol. 265. – № 1-2. – P. 133-136.

8. Oscillations of Skin Microvascular Blood Flow in Patients with Asthma / I. V Tikhonova, N. I. Kosyakova, A. V Tankanag, N. K. Chemeris // Microcirculation. – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 33-43.
9. Hypoxia-induced endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice; effects of infliximab and l-glutathione / I. Tuleta, C. N. França, D. Wenzel [et al.] // Atherosclerosis. – 2014. – Vol. 236. – № 2. – P. 400-410.
10. Sobczak, M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. / M. Sobczak, J. Dargatz, M. Chrzanowska-Wodnicka // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2010. – № 46.
11. Wu, D. Induction and testing of hypoxia in cell culture. / D. Wu, P. Yotnda // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2011. – № 54.
12. Nitric oxide release follows endothelial nanomechanics and not vice versa / J. Fels, C. Callies, K. Kusche-Vihrog, H. Oberleithner // Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. – 2010. – Vol. 460. – № 5. – P. 915-923.
13. Study of the Synchronization and Transmission of Intracellular Signaling Oscillations in Cells Using Bispectral Analysis. Vol. 13 / M. E. Astashev, D. A. Serov, A. V Tankanag [et al.]. – 2024.
14. tmem33 is essential for VEGF-mediated endothelial calcium oscillations and angiogenesis / A. M. Savage, S. Kurusamy, Y. Chen [et al.] // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 732.
15. Acetylcholine Promotes Ca²⁺ and NO-Oscillations in Adipocytes Implicating Ca²⁺→NO→cGMP→cADP-ribose→Ca²⁺ Positive Feedback Loop - Modulatory Effects of Norepinephrine and Atrial Natriuretic Peptide / E. A. Turovsky, M. V Turovskaya, L. P. Dolgacheva [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. e63483.
16. Nitric Oxide Causes a cGMP-Independent Intracellular Calcium Rise in Porcine Endothelial Cells—A Paradox? / R. Berkels, S. Suerhoff, R. Roesen, W. Klaus // Microvascular Research. – 2000. – Vol. 59. – № 1. – P. 38-44.
17. CaMKII regulates intracellular Ca²⁺ dynamics in native endothelial cells

/ F. Toussaint, C. Charbel, A. Blanchette, J. Ledoux // Cell Calcium. – 2015. – Vol. 58. – № 3. – P. 275-285.

18. Nitric Oxide–Dependent Feedback Loop Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Channel Cooperativity and Endothelial Function in Small Pulmonary Arteries / C. Marziano, K. Hong, E. L. Cope [et al.] // Journal of the American Heart Association. – 2025. – Vol. 6. – № 12. – P. e007157.

19. Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-reoxygenation triggering NAD(P)H depletion / J. Boslett, C. Hemann, F. L. Christofi, J. L. Zweier // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2017. – Vol. 314. – № 3. – P. C297-C309.

20. Endothelin / A. P. Davenport, K. A. Hyndman, N. Dhaun [et al.] // Pharmacological Reviews. – 2016. – Vol. 68. – № 2. – P. 357-418.

21. Increased Vascular Contractility in Hypertension Results From Impaired Endothelial Calcium Signaling / C. Wilson, X. Zhang, C. Buckley [et al.] // Hypertension. – 2019. – Vol. 74. – № 5. – P. 1200-1214.

22. Calcium Release from Endoplasmic Reticulum Involves Calmodulin-Mediated NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Production in Endothelial Cells. Vol. 20 / R. Sakurada, K. Odagiri, A. Hakamata [et al.]. – 2019.

23. Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells involves TRPV4 / K. Suresh, L. Servinsky, J. Reyes [et al.] // American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2015. – Vol. 309. – № 12. – P. L1467-L1477.

24. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. / S. Kourembanas, P. A. Marsden, L. P. McQuillan, D. V Faller // The Journal of Clinical Investigation. – 1991. – Vol. 88. – № 3. – P. 1054-1057.

25. Kumar, G. K. Hypoxia. 3. Hypoxia and neurotransmitter synthesis / G. K. Kumar // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2011. – Vol. 300. – № 4. – P. C743-C751.

Оригинальность 80%