

УДК 616-092

Оценка продукции оксида азота эндотелиальными клетками EA.hy926 при механическом стрессе, создаваемом потоком в микрофлюидной системе

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

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

Эндотелиальные клетки, выстилающие стенки сосудов, преобразовывают деформацию собственных структур, вызванную током крови, в химические сигналы, одним из которых является важный регулятор просвета сосуда – оксид азота (NO). К настоящему моменту накоплен большой объем данных о клеточных механизмах активации продукции NO, однако сведений о динамике генерации оксида азота эндотелиальными клетками в зависимости от гидродинамических условий недостаточно. В этой связи разработка микрофлюидных систем *in vitro*, имитирующих кровеносное русло, и изучение в них эндотелия в сложных гидродинамических условиях является актуальной задачей.

В данной работе для создания контролируемых гидродинамических условий для монослоя эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 была спроектирована и разработана микрофлюидная система, имитирующая линейные участки микрососудистого русла. Методом непрямого определения содержания оксида азота (II) NO с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина DAF-2 впервые получены данные об увеличении продукции NO клетками EA.hy926 при механическом стрессе, создаваемом потоком ростовой среды. Представлены расчетные гидродинамические характеристики микрофлюидной системы, а также методика измерения продукции NO. Возможность исследования функциональной активности эндотелия позволяет использовать разработанную микрофлюидную модельную систему как для изучения клеточно-автономных регуляторных свойств эндотелия при действии ряда вазоактивных фармакологических препаратов и других методов воздействия на эндотелий, так и при моделируемой дисфункции эндотелия.

Ключевые слова: микрофлюидная система; микрофлюидика; моделирование сосудов; эндотелиальные клетки; EA.hy926; гидродинамические условия; механический стресс; оксид азота (NO); дисфункция эндотелия; eNOS.

Для цитирования: Московцев А.А., Мыльникова А.Н., Колесов Д.В., Микрюкова А.А., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Оценка продукции оксида азота эндотелиальными клетками EA.hy926 при механическом стрессе, создаваемом потоком в микрофлюидной системе. *Патогенез*. 2020; 18(4): 71-77.

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.04.71-77

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.10.2020

Estimation of nitric oxide generation by endothelial cells EA.hy926 under flow-induced mechanical stress in a microfluidic system

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

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuing Vocational Education,
Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

Endothelial cells lining vascular walls transform the flow-induced deformation of their own structures into chemical signals, one of which, nitric oxide (NO), is an important regulator of the vascular lumen diameter. By present, a large amount of data on cellular mechanisms for activation of NO production has been accumulated. However, there is insufficient information on changes in endothelial NO generation under different hydrodynamic conditions. Therefore, development of microfluidic systems that model blood vessels *in vitro* and using them to study the endothelium under complex hydrodynamic conditions are relevant tasks.

In this study, a microfluidic system was developed to create controlled hydrodynamic conditions for a monolayer of endotheliocyte-like cells EA.hy926. This system simulates linear sections of the microvasculature. By indirect measurement of NO (II) content with a fluorescent 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) probe, we showed an increase in the NO production by EA.hy926

cells under mechanical stress generated by the medium flow. The article presents the method for measuring NO production and the calculated hydrodynamic characteristics of the microfluidic system. The results showed that the developed microfluidic model system is promising for studying cell-autonomous regulatory properties of the endothelium both under the action of vasoactive agents and in simulated endothelial dysfunction.

Key words: microfluidic system; microfluidics; vascular modeling; endothelial cells; EA.hy.926; hydrodynamic conditions; mechanical stress; nitric oxide (NO); endothelial dysfunction; eNOS.

For citation: Moskovtsev A.A., Mylnikova A.N., Kolesov D.V., Mikryukova A.A., Zaychenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. [Estimation of nitric oxide generation by endothelial cells EA.hy926 under flow-induced mechanical stress in a microfluidic system]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2020; 18(4): 71-77. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.04.71-77

For correspondence: Moskovtsev Aleksey Aleksandrovich, e-mail: bioinf@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 18.10.2020

Введение

Эндотелиальные клетки, выстилающие стенки сосудов, обладают развитой механочувствительностью: они передают и преобразовывают информацию о деформации различных собственных структур, вызванной током крови, в химические сигналы. Последние изменяют состояние самих эндотелиальных клеток (аутокринная регуляция), а также управляют клеточным микроокружением — в частности, продуцируемый оксид азота вызывает расслабление гладкомышечных клеток стенки сосуда, увеличивая его просвет (паракринная регуляция). Данный механизм обратной связи важен для локальной регуляции кровотока.

Среди составляющих поля сил, действующих на эндотелиоциты, большое значение имеет тангенциальный компонент сдвигового напряжения, позволяющий клеткам «детектировать» кровоток. 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, так, что в качестве механосенсора может выступать весь цитоскелет эндотелиальной клетки с ассоциированными сигнальными каскадами, активирующимися в определенных «горячих» точках [1]. Эти сигнальные системы участвуют в трансдукции механической деформации и, по-видимому, формируют специфические для действующих на клетку сил комбинации сигнальных молекул разной химической природы, транскрипционных факторов, кодируя информацию о сдвиговой деформации и передавая её в ядро. Активирующаяся в ответ на это экспрессия генов формирует долговременные изменения в цитоскелете, направленные на адаптацию клетки к механической нагрузке [2].

NO продуцируется в эндотелиальных клетках конститутивно экспрессирующейся NO-синтазой (NOS) — оксидоредуктазой, представленной в гомодимерной форме и состоящий из N-концевого оксигеназного домена, который содержит сайты связывания для

субстрата L-аргинина, кофактора тетрагидробиоптерина (BH4) и гема, а также редуцтазного домена с сайтами связывания для доноров электронов никотинамидениндинуклеотидфосфата (NADPH), флавинадениндинуклеотида (FAD) и флавиномононуклеотида (FMN). Домены соединены последовательностью, которая связывает кальмодулин в комплексе с кальцием (Ca^{2+}) [3]. После активации NOS флавины в домене редуцтазы переносят полученные от NADPH электроны к гему в оксигеназном домене соседнего мономера, что способствует связыванию кислорода (O_2) с восстановленным железом гема (Fe^{2+}) и превращению субстрата L-аргинина в NO-L-аргинин, затем в NO и L-цитруллин [3]. Рекрутирование комплекса кальций-кальмодулин считается важным для переноса электронов.

Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ассоциировано с ростом активности eNOS, более того, связывание кальция и, как считают некоторые авторы, резкий рост его уровня необходимы для работы ферментов эндотелиальной eNOS и нейрональной nNOS, но не индуцибельной iNOS, способной функционировать при базовых концентрациях кальция в связи с высоким сродством к кальмодулину. Тем не менее, eNOS может быть активирован рядом сигналов без существенного повышения уровня внутриклеточного кальция. Сдвиговое напряжение увеличивает уровень внутриклеточного кальция, однако были замечены несоответствия в динамике кальциевой сигнализации и продукции NO при сдвиговой деформации [4]. Было показано, что в начале действия сдвигового напряжения продукция NO Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой эндотелиальной NO-синтазой (eNOS) возрастает в диапазоне от двух- до четырехкратного превышения базального уровня и поддерживается на всём 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+} [1]. Вторая фаза роста генерации NO связана с фосфорилированием eNOS киназами Akt и PKA. Однако, регуляция продукции NO не ограничивается указанными механизмами: уровень eNOS может модулироваться на транскрипционном, посттранскрипционном (стабилизация

мРНК [5]; экспрессия микроРНК и др), посттрансляционном (конъюгация с липидами и локализация; фосфорилирование; гликозилирование; нитрозилирование и др) уровнях [6]. С учетом сложности этой регуляции и тем фактом, что в результате гиперпродукции оксида азота может возрасти уровень свободных радикалов и снижаться функциональная активность клеток, интегральная оценка продукции NO является важным индикатором функционального состояния эндотелиоцитов.

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 [7].

В местах сосудистого русла с неоднородными гидродинамическими условиями в виде реверсивных течений и турбулентности падения активности сигнальных систем, ассоциированных со сдвиговой деформацией, не наблюдается, что может приводить к индукции провоспалительных путей в эндотелии [2]. В этих регионах, например, зонах ветвления сосудов, эндотелий даже в норме может экспрессировать на низком уровне маркеры воспаления и более предрасположен к развитию атеросклероза. Так, у здоровых свиней обнаруживалась повышенная активация провоспалительного пути, опосредуемого транскрипционным фактором NF κ B, а также снижение экспрессии синтазы оксида азота [8].

На настоящий момент накоплен большой объем данных о клеточных механизмах активации продукции NO, однако, сведений о динамике генерации оксида азота эндотелиальными клетками и её зависимости от гидродинамических условий недостаточно. В условиях экспериментов *in vivo*, как правило, сложно исключить все регуляторные эффекты, оставив только клеточно-автономные. Традиционные системы *in vitro*, в частности, культуры клеток эндотелия, дают возможность изучения отдельных субклеточных элементов системы регуляции кровотока. Однако в статических культурах клеток отсутствует важнейший фактор – поток. Микрофлюидные устройства (МФУ) обладают рядом преимуществ по сравнению со статическими культурами клеток и традиционными проточными системами изучения эндотелия. МФУ позволяют точно задавать геометрию микроканалов, имитирующих сосудистое русло, и методами вычислительной гидродинамики рассчитывать поле создаваемых потоком сил, действующих на клетки.

В соответствии с законом Пуазейля, сдвиговое напряжение обратно пропорционально кубу радиуса сечения круглого канала и прямо пропорционально объёмной скорости, поэтому в микромасштабе возможно достижение больших величин сдвиговой деформации при сравнительно низких волюметрических значениях. Таким образом, представляется актуальной задачей построение микрофлюидных систем, имитирующих

кровеносное русло и изучение в них продукции оксида азота эндотелиальными клетками в сложных гидродинамических условиях, включающих, например, пространственные и временные вариации величины сдвигового напряжения.

Материалы и методы исследования

Проектирование, вычислительная гидродинамика и производство микрофлюидных чипов. Для моделирования элементов сосудистого русла нами были использованы МФУ из полидиметилсилоксана. МФУ разрабатывались с использованием систем автоматизированного проектирования (САПР). При этом задавалась геометрия будущего устройства и рассчитывались параметры потока жидкости в чипе, такие, как траектории течения, поле скоростей, распределение сдвигового напряжения на стенке. Для моделирования течения ростовой среды через микрофлюидный чип мы использовали условие объёмного расхода для входа жидкости и условие постоянного давления окружающей среды на выходе. В качестве модельной жидкости использовалась вода. Все вычисления происходили при постоянной температуре – 37°C. Вычисления состоят из дискретизации зависящих от времени уравнений Навье-Стокса и решении их на расчетной сетке.

Микрофлюидные чипы (МФЧ) изготавливались методом мягкой литографии. Метод основан на перенесении трёхмерной структуры с твердой матрицы на полимерную реплику с микрометровым разрешением. По спроектированным в САПР трёхмерным моделям чипов создавали модели матриц, которые затем были переведены в управляющую программу для фрезерного станка. Матрицы были изготовлены на вертикальном обрабатывающем фрезерном центре с ЧПУ. В качестве материала для изготовления тела чипа был использован полидиметилсилоксан (ПДМС). Смесь двух компонентов из коммерчески доступного набора в пропорции 1:10 заливали в изготовленную форму и вулканизировали при температуре 80 °C в течение 2 часов. После вулканизации, заготовку извлекали из формы, в ней проделывали технологические отверстия для ввода подводящих трубок, и пришивали к подложке. В качестве подложки мы использовали покровные стекла толщиной 150 мкм с целью дальнейшего исследования чипа с помощью конфокальной микроскопии. Для надежной пришивки заготовка и подложка обрабатывались кислородной плазмой при давлении 0,5–1,0 мм рт.ст и плотно прижимались друг к другу.

Сборка перфузионной системы. Готовый чип подключали к замкнутой проточной системе на основе прецизионной дозирующей системы Nemesys (Cetoni, Германия). Данная система обеспечивает практически безимпульсную подачу жидкости, благодаря использованию сервомоторов и ПИД-регулирования с обратной связью для определения положения и скорости подачи. Контроль температуры осуществлялся с помощью тер-

моэлектрического модуля Пельтье, управляемого контроллером с обратной связью по температуре. Для поддержания температуры в заданном диапазоне был использован ПИД-регулятор.

Клеточная линия. Для имитации выстилки сосуда была использована гибридная эндотелиоцитоподобная клеточная линия EA.hy926, любезно предоставленная Dr. C.J. Edgel (University of North Carolina, USA). Линия была получена путем слияния первичной эндотелиальной клеточной линии HUVEC с клеточной линией аденокарциномы легкого A-549.

Для культивирования клеток использовали среду DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамин, 1% NEAA и фактора роста NAT. Культивирование проходило в инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37°C в 5% CO₂/95% воздушной атмосфере. При культивировании в микрофлюидном чипе без обогащения атмосферы углекислым газом в среду дополнительно добавляли HEPES с конечным содержанием 20 mM для поддержания необходимого уровня pH и препятствия закисления среды в процессе жизнедеятельности клеток.

Загрузка клеток в чип. Для загрузки в чип использовалась клеточная суспензия 9,5 млн. клеток в 1 мл питательной среды DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10 % инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамин, 1% NEAA и фактора роста NAT, также дополнительным добавлением 20 mM HEPES буфера. Полученная суспензия загружалась в микрофлюидную систему с помощью шприца.

Перфузия микрофлюидной системы. Для моделирования физиологической сдвиговой деформации в диапазоне 2–6 Па, а также минимальной сдвиговой деформации в 0,01 Па, применялась система шприцевых помп Nemesys (Cetoni, Германия).

Определение оксида азота. Для определения изменений в уровне продукции NO в статических условиях к клеткам EA.hy926, предварительно за 24 часа до эксперимента рассеянным на 12-луночную плашку, добавляли растворенный в ДМСО форболовый эфир Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) до конечных концентраций 0-20 нМ и инкубировали 18 часов. Затем проводили смену среды на DMEM без фенолового красного (FluoroBrite, Thermo Fisher Scientific) с 10% FBS, 1 мкМ кальциевого ионофора A23187, 100 мкМ L-аргинина, 1 мкМ зонда DAF-2 и инкубировали 2 часа, после чего среду собирали и анализировали на спектрофлуориметре Horiba Fluoromax4 с использованием микрокюветы объемом 130 мкл. Следует отметить, что FluoroBrite содержит 1,8 mM ионов кальция. Для регистрации флуоресценции использовали режим автоматизированного измерения с последовательным снятием спектров на длинах волн возбуждения 495 нм и 485 нм, что соответствует максимуму возбуждения DAF-2T — продукта взаимодействия зонда DAF-2 с оксидом азота (III) (см. ни-

же) — и собственно зонда DAF-2 соответственно. Значение интенсивности эмиссии флуоресценции DAF-2T при 515 нм корректировали, таким образом, на фоновую флуоресценцию DAF-2 при 538 нм.

Цифровая обработка микрофотографий и статистический анализ. Для обработки микрофотографий 5,5 использовали программное обеспечение ImageJ. Статистический анализ проводили в среде Statistica 10, различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Проектирование и гидродинамический расчет микрофлюидного чипа. Для изучения продукции NO эндотелиальными клетками при сдвиговом напряжении нами был разработан микрофлюидный чип (МФЧ) с двумя симметричными каналами сечением 250 × 200 мкм (рис. 1, А, Б). Один канал нами использовался в качестве контрольного — в нем поддерживалась минимальная объемная скорость, необходимая для обновления среды (2 мкл/мин), во втором создавалось сдвиговое напряжение при подаче ростовой среды с объемной скоростью 100 мкл/мин.

Анализ продукции оксида азота эндотелиоцитоподобными клетками EA.hy926. Для оценки функционального состояния эндотелиальных клеток EA.hy926 при действии потока в каналах микрофлюидной системы впервые был применен метод непрямого определения продукции оксида азота (II) с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина DAF-2. Принцип непрямого детектирования NO основан на взаимодействии зонда DAF-2 с продуктом окисления NO — оксидом азота (III), образующегося в ходе быстро протекающей реакции между неокисленным NO и уже окисленным NO до оксида азота (IV) NO₂, при этом стехиометрическое соотношение между DAF-2 и NO составляет 1:2 [9, 10]. Продуктом данной реакции является высокофлуоресцирующее соединение — триазол DAF-2T, квантовый выход которого превышает DAF-2 в 180 раз [10, 11]. Способность клеток линии EA.hy926 продуцировать NO была проанализирована в статических условиях (в отсутствие потока) с использованием активатора eNOS — кальциевого ионофора A23187, а также транскрипционного индуктора eNOS — форболового эфира Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA. Как видно из рис. 2, А, 5 нМ PMA приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в 1,2 раза, что свидетельствует о росте продукции NO.

Для анализа в условиях потока нами были использованы объемные скорости 2 мкл/мин и 100 мкл/мин и максимальной сдвиговой деформацией ~0,01 Па и ~5,50 Па соответственно (рис. 2, Б). В ходе проведенных исследований установлено, что действие сдвигового напряжения приводит к увеличению интенсивности флуоресценции зонда, указывающее на рост концентрации продуктов окисления NO. Однако, при соответствующем физиологическому уровню сдвиговой деформации

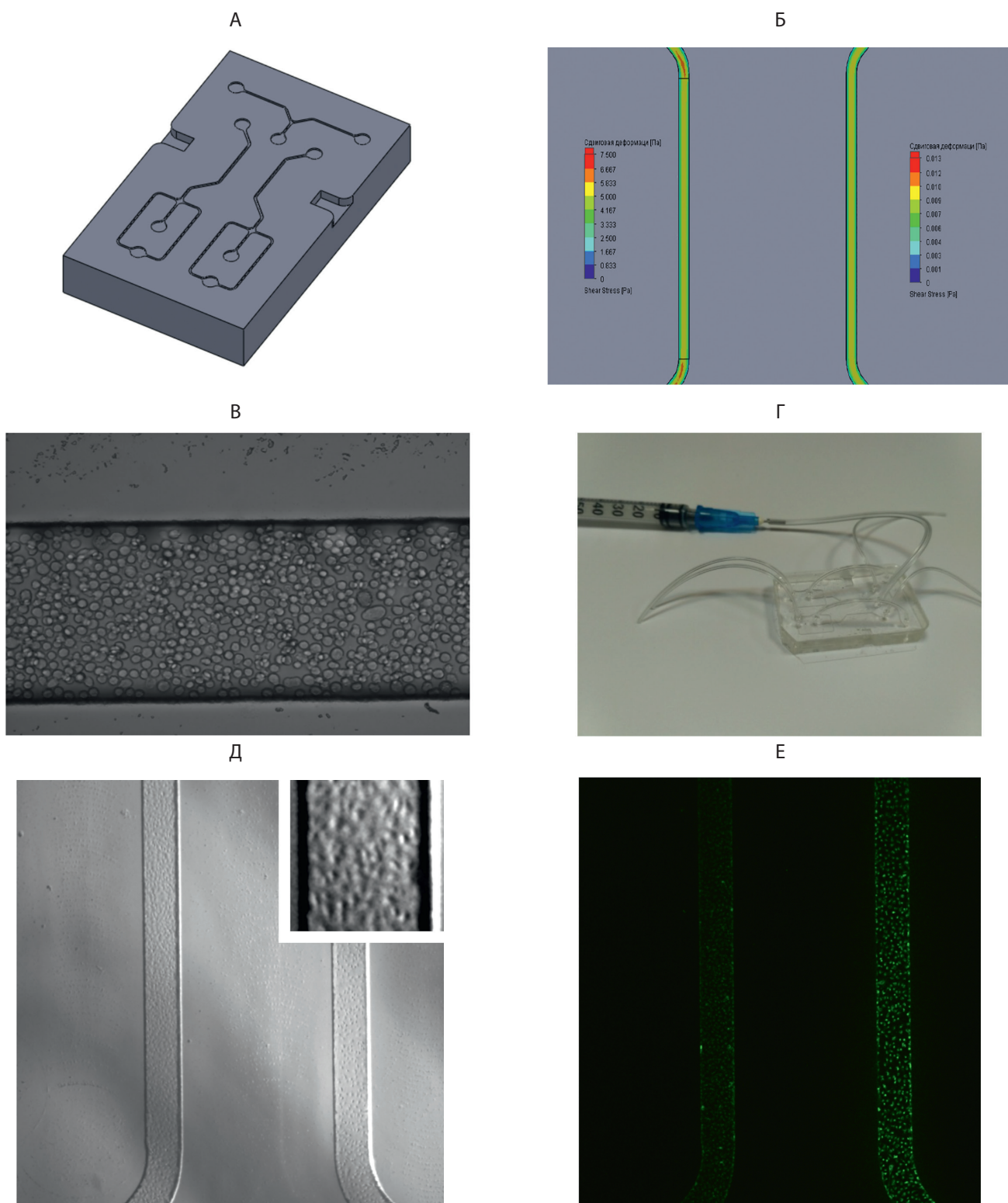


Рис. 1. Микрофлюидный чип. А – трёхмерная модель. Б – тепловая карта распределения интенсивности сдвиговой деформации в двух независимых микроканалах чипа, при объёмной скорости потока 100 мкл/мин в левом канале и 2 мкл/мин – в правом. В – суспензия клеток в микроканале перед адгезией. Г – фотография микрочипа, используемого в экспериментах по анализу зависимости продукции оксида азота NO от величины деформации сдвига. Д – микрофотография в проходящем свете этого микрочипа со слоем адгезировавших в двух независимых каналах эндотелиальных клеток EA.hy926, используемых в экспериментах по анализу зависимости продукции оксида азота NO от величины сдвигового напряжения при объёмной скорости потока 100 мкл/мин в правом канале и 2 мкл/мин – в левом; в правом верхнем углу представлен увеличенный фрагмент микроканала с адгезировавшими клетками. Е – микрофотография, полученная с помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии, этого микрочипа; Для изучения особенностей функционального состояния клеток были использованы липидные флуоресцентно меченые наночастицы: видно, что в канале с высокой сдвиговой деформацией интенсивность флуоресценции клеток выше, что может свидетельствовать о более интенсивном захвате ими наночастиц.

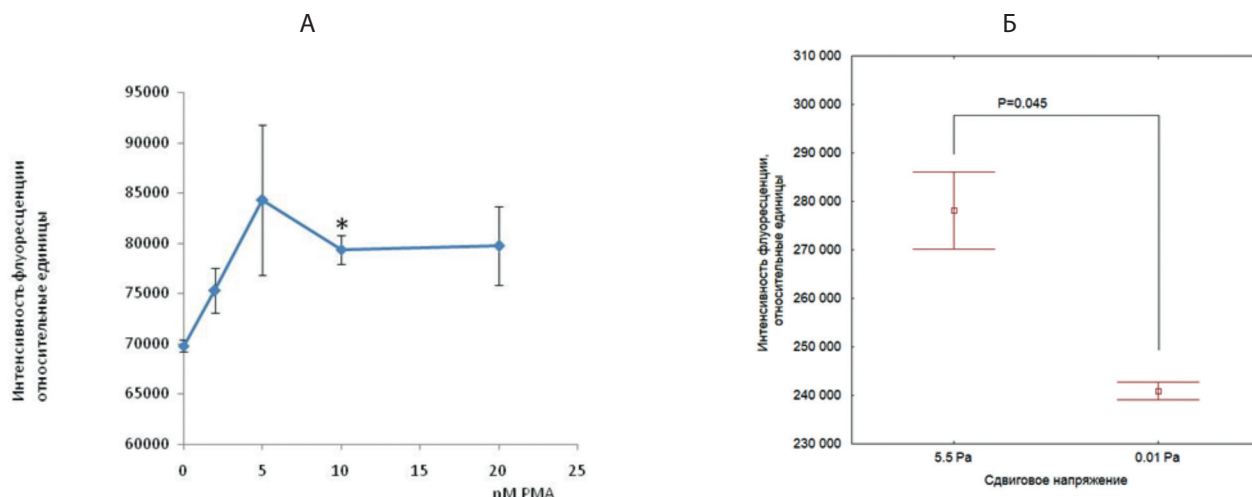


Рис. 2. Определение продукции NO клетками EA.hy926 в статических условиях и в потоке. А – интенсивность флуоресценции при 515 нм (возбуждение 495 нм), скорректированная на фоновую флуоресценцию при 538 нм (возбуждение 485 нм) при добавлении зонда DAF-2 к предварительно активированным эндотелиальным клеткам EA.hy926 форболовым эфиром (PMA) в диапазоне указанных концентраций в течении 18 часов, в присутствии 1 мкМ кальциевого ионофора A23187, 100 мкМ L-аргинина. * – $p < 0,05$ ($n = 3$, Т-тест Стьюдента, представлены среднее и стандартное отклонение). Б – интенсивность флуоресценции при 515 нм (возбуждение 495 нм), скорректированная на фоновую флуоресценцию при 538 нм (возбуждение 485 нм) сред FluoroBrite, прокачанных с постоянной скоростью 100 мкл/мин и 2 мкл/мин в течение 4 часов в независимых каналах микрофлюидного устройства с инкубируемым в них клетками EA.hy926 в присутствии 100 мкМ L-аргинина ($n = 2$, критерий Краскела-Уолиса, представлены медиана и 25%-75% процентиля).

~5.50 Па при объемном расходе 100 мкл/мин прирост концентрации продуктов окисления NO в микрофлюидной системе оказывается сравнительно небольшим (в ~1,15 раза) по сравнению с квазистатическими условиями (2 мкл/мин) в чипе. Это может быть обусловлено значительным разбавлением продукта ввиду незамкнутой конфигурации микрофлюидной системы.

Таким образом, в данной работе для изолированного монослоя эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 в микрофлюидной системе, имитирующей микрососудистое русло, впервые получены данные об увеличении продукции NO при росте сдвигового напряжения. Это открывает новые возможности использования разработанной микрофлюидной модельной системы как для изучения функционального состояния эндотелия при действии ряда вазоактивных фармакологических препаратов и других методов воздействия на эндотелий, так и при моделируемой дисфункции эндотелия.

Список литературы

- Fleming I., Fisslthaler B., Dixit M., Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2005; 118(18): 4103-4111. DOI: 10.1242/jcs.02541
- Московцев А.А., Колесов Д.В., Мылникова 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
- Farah C., Michel L.Y.M., Balligand J.L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2018, 15(5): 292-318. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.224
- Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch.* 2010, 459(6): 793-806. DOI: 10.1007/s00424-009-0767-7

- Davies P.F., Spaan J.A., Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann. Biomed. Eng.* 2005, 33(12): 1714-1718. DOI: 10.1007/s10439-005-8774-0
- Balligand J.L., Feron O., Dessy C. eNOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol. Rev.* 2009, 89(2): 481-534. DOI: 10.1152/physrev.00042.2007
- Davies P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* 1995, 75(3): 519-560. DOI: 10.1152/physrev.1995.75.3.519
- García-Cardeña G., Comander J., Anderson K.R., Blackman B.R., Gimbrone M.A. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98(8): 4478-4485. DOI: 10.1073/pnas.071052598
- Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 1998, 70(13): 2446-2453. DOI: 10.1021/ac9801723
- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: Diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 1998, 427(2): 263-266. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00440-2
- Leikert J.F., Räthel T.R., Müller C., Vollmar A.M., Dirsch V.M. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett.* 2001, 506(2): 131-134. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02901-5

References

- Fleming I., Fisslthaler B., Dixit M., Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2005; 118(18): 4103-4111. DOI: 10.1242/jcs.02541
- 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].* 2017, 61(4): 112-125. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8531 (in Russian)
- Farah C., Michel L.Y.M., Balligand J.L. Nitric oxide signalling in

- cardiovascular health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2018, 15(5): 292-318. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.224
4. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch.* 2010, 459(6): 793-806. DOI: 10.1007/s00424-009-0767-7
 5. Davies P.F., Spaan J.A., Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann. Biomed. Eng.* 2005, 33(12): 1714-1718. DOI: 10.1007/s10439-005-8774-0
 6. Balligand J.L., Feron O., Dessy C. eNOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol. Rev.* 2009, 89(2): 481-534. DOI: 10.1152/physrev.00042.2007
 7. Davies P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* 1995, 75(3): 519-560. DOI: 10.1152/physrev.1995.75.3.519
 8. García-Cardeña G., Comander J., Anderson K.R., Blackman B.R., Gimbrone M.A. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98(8): 4478-4485. DOI: 10.1073/pnas.071052598
 9. Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 1998, 70(13): 2446-2453. DOI: 10.1021/ac9801723
 10. Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: Diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 1998, 427(2): 263-266. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)00440-2
 11. Leikert J.F., Räthel T.R., Müller C., Vollmar A.M., Dirsch V.M. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett.* 2001, 506(2): 131-134. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02901-5

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; доцент кафедры общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мыльникова Алёна Николаевна — научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Колесов Дмитрий Валерьевич — научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Микрюкова Анна Алексеевна — младший научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Зайченко Данила Михайлович — научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Соколовская Алиса Анатольевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Кубатиев Аслан Амирханович — доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>