

Визуализация, состав и структура эндотелиального гликокаликса

А.В. Максименко, А.Д. Турашев

Институт экспериментальной кардиологии, Федеральное Государственное Учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва

Абстракт

В норме на поверхности эндотелия кровеносных сосудов присутствует сложная многокомпонентная система, называемая гликокаликсом. Структура гликокаликса определяется группой протеогликанов, гликопротеинов и гликозаминогликанов, берущих начало из клеток эндотелия и кровотока. Благодаря своей комплексности и расположению на границе системы циркуляции крови, гликокаликс принимает участие в ряде функций, поддерживающих стенки сосуда. В условиях патологии происходит полная или частичная потеря этой структуры, что приводит к нарушению целостности сосудистой стенки и изменению ее функций. В первой части настоящего обзора рассматриваются история обнаружения и определения структуры гликокаликса эндотелия, используемые при этом методы и подходы. Подробно описан молекулярный состав гликокаликса, свойства компонентов и его общая структура.

Ключевые слова: эндотелий, гликокаликс, протеогликаны, гликопротеины, гликозаминогликаны, прижизненная микроскопия.

Visualization, composition and structure of endothelial glycocalyx

A.V. Maksimenko & A.D. Turashev

Abstract

In normal state, a complex multicomponent system called glycocalyx is present on the surface of endothelial vascular system. The structure of the glycocalyx is determined by a group of proteoglycans, glycoproteins and glycosaminoglycans, originating from endothelial cells and blood flow. Due to its complexity and location on the border of the system of blood circulation, glycocalyx participates in a number of functions supporting the metabolism of the vascular wall. In pathological conditions undergo complete or partial loss of this structure, which leads to inconsistencies in the vascular wall and change its functions. In the first part of this review considers the history of detection and determination of endothelial glycocalyx structure, utilized methods and approaches. Described in detail the molecular composition of the glycocalyx, properties of its components and overall glycocalyx structure.

Key words: endothelium, glycocalyx, proteoglycans, glycoproteins, glycosaminoglycans, spatial structure, in vivo microscopy.

Практически все эндотелиальные клетки тканей и органов в физиологических условиях покрыты с люминальной стороны сосудистой стенки слоем разнообразных связанных с эндотелиальной мембраной макромолекул, совокупность которых представляет эндотелиальный гликокаликс (ЭГК) [1]. В его состав входят белково-углеводные и углеводно-липидные комплексы, а также расположенные на его поверхности белки плазмы крови, формирующие выстилку эндотелия со специфичной структурой и широким набором функций. Аналогичные структуры также присутствуют на апикальной поверхности эпителиальных клеток, выстилающей множество органов человека, а входящие в состав гликокаликса соединения присутствуют в межклеточном матриксе всех тканей [2, 3].

Визуализация эндотелиального гликокаликса

Впервые концепция наличия на сосудистой стенке подобной структуры была предложена группой исследователей в 1940 году [4] и несколько раз впо-

следствии пересматривалась [5, 6]. Однако первая визуализация гликокаликса была выполнена лишь в 1966 году с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии с использованием катионного красителя рутения красного в микрососудистой сети слизистой оболочки кишечника крысы [7]. Использованный в этом исследовании краситель может связываться с кислыми мукополисахаридами и генерировать области электронной плотности в присутствии четырехоксида осмия. Этот подход позволил визуализировать на поверхности капиллярной стенки волокнистую, кисточковидную структуру, толщина которой составляла примерно 20 нм. Косвенные данные существования подобной структуры были также получены при оценке капиллярного гематокрита скелетной мышцы [8], сетевого моделирования и измерения сосудистого сопротивления в сосудах диаметром до 30 мкм в сравнении с кварцевыми трубками аналогичного диаметра [9]. Расчетные значения толщины гликокаликса в этих экспериментах составляли около 1 мкм. Более того, использование разрушающего гликокаликс фер-

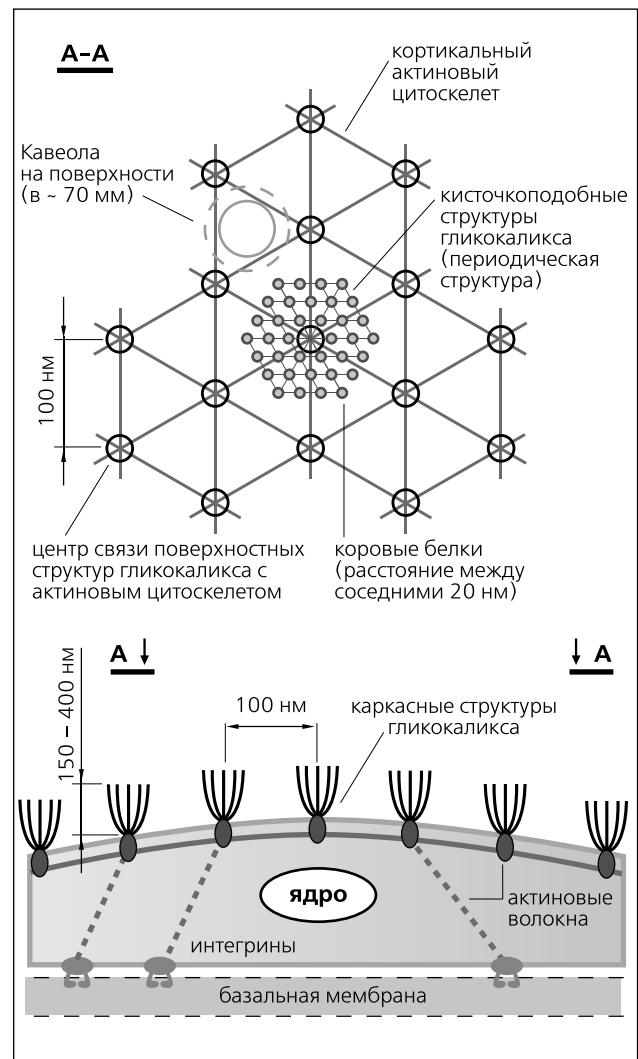
мента гепариназы приводило к двукратному увеличению гематокрита капилляров [10] и снижению сосудистого сопротивления [11], что подтверждало первоначальные предположения и указывало на то, что гликокаликс снижает скорость кровотока в пристеночном сегменте сосуда.

Эти работы вызвали повышенный интерес к визуализации гликокаликса с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и различных специфичных маркеров, способных связываться с компонентами ЭГК и позволяющими определять их наличие и расположение. Для этого были использованы такие маркеры, как коллоидное золото [12], иммунопероксидазное маркирование [13] и высокозаряженные белки, например, катионизированный ферритин [14]. Аналогичный подход использовался и для изучения влияния напряжения сдвига кровотока на толщину гликокаликса и его способность в подобных условиях индуцировать поглощение белков плазмы клетками эндотелия [15]. Толщина ЭГК в этих исследованиях ненамного превышала первоначально установленную толщину (в 1,5-2 раза), но противоречила рассчитанным величинам математических моделей [16-19]. Использование катионизированного ферритина также продемонстрировало, что для поддержания целостности ЭГК должен существовать контакт этой структуры с белками плазмы крови, и что в действительности толщина ЭГК может значительно превышать ранее установленные значения 20-40 нм. Предложенные методики приготовления препаратов для микроскопии, как оказалось, не отражали реальную структуру ЭГК из-за использования фиксаторов на основе водных носителей, которые, по-видимому, растворяли и удаляли большинство компонентов за исключением основных каркасных структур ЭГК. Для предотвращения разрушения структуры ЭГК были разработаны новые протоколы окрашивания и фиксации препаратов. Так, использование в качестве красителя алциана голубого 8GX позволило визуализировать методом трансмиссионной электронной микроскопии в капиллярах миокарда крысы ЭГК толщиной 200-500 нм, которая после обработки ферментом гиалуронидазой сокращалась до 100-200 нм [20]. Замена водных фиксаторов на фторуглеродные [21, 22] и использование глутарового альдегида [23, 24] показали, что толщина ЭГК достигает 60-200 нм в гломерулярных капиллярах и 50-100 нм в фенестрированных капиллярах кишечника. Тем не менее, основным минусом методов визуализации ЭГК на основе микроскопии, помимо возникающих артефактов фиксации при изготовлении препаратов, состоит в том, что они не способны визуализировать интактный ЭГК в условиях *in vivo*.

Несмотря на ряд недостатков, вышеуказанные методики визуализации с использованием электронной микроскопии помогли установить его ультраструктуру и связь основных каркасных структур ЭГК с кортикальным актиновым скелетом эндотелиальных клеток. Для этого полученные с помощью

ТЭМ данные визуализации капилляров брыжейки лягушки в приготовленных различными способами (замораживанием и химической фиксацией) препаратах [25, 26] подвергали компьютерной обработке с использованием автокорреляционных функций и Фурье-преобразования. Полученная ультраструктурная модель (Рис. 1) была использована для дальнейшего математического моделирования поведения ЭГК в различных условиях его окружения [27, 28].

Рисунок 1. Вид идеализированной математической модели структуры эндотелиального гликокаликса, демонстрирующей гексагональное распределение каркасных белков (А-А) и связи их с цитоскелетом (А).



Другим косвенным подходом визуализации ЭГК в сегментах микрососудистого русла является прижизненная микроскопия. Разработанный в середине девяностых годов прошлого века подход, получивший название "методика высвобождения красителя" (dye-exclusion technique) [29], определял ЭГК как пустую зону (пробел – gap) между стенкой капилляра и движущимися последовательно друг за другом в кровотоке эритроцитами. Кроме того, в кровотоки вводили флуоресцентное высокомолекулярное соединение, FITC-декстран (меченный

флуоресцеин изоционатом декстран, 70 кДа), который практически не проникал в ЭГК. Использование этой методики позволило определить толщину ЭГК *in vivo* в капиллярах поддерживающей тестикулы (крематерной) мышцы хомья, который составил 0,4-0,5 мкм. Указанная ткань идеально подходит для микроскопии *in vivo* из-за своей низкой толщины и полупрозрачности, четкой визуализации клеток эндотелия и кровотока, возможности измерения локальных скоростей кровотока. Полученный результат подтвердил разрушение поверхностных структур ЭГК при его визуализации микроскопией *ex vivo*, что способствовало появлению множества работ на основе этой методики. Методом прижизненной микроскопии наблюдалось взаимодействие лейкоцитов с сосудистой стенкой во время их присоединенного перекачивания (роллинга) в присутствии ЭГК [30]; сжатие ЭГК эритроцитами при блокировании кровотока и его последующего восстановления при снятии окклюзии [29]; выявления действия на ЭГК активных форм кислорода и окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛНП) [31]. Существенными ограничениями этой методики является отсутствие прямой визуализации структуры ЭГК и тот факт, что методика не позволяет визуализировать сосуды крупнее 12-15 мкм из-за возникающих оптических искажений.

Для визуализации ЭГК в более крупных сегментах циркуляторного русла была использована методика прижизненной лазерной анемометрии по изображениям микрочастиц (*intravital microparticle image velocimetry*, мк-PIV-метод) [32]. Хотя этот метод (характеризуемый авторами как микровискозиметрия) также не предоставляет прямой визуализации, с его помощью можно получать данные о характере распределения скоростей по всему профилю сечения микрососуда. Суть мк-PIV-метода заключается в том, что исследуемая ткань (рассматривались венулы в крематерной мышце хомья), перфузируемая флуоресцентными микрочастицами (мечеными FITC), облучается астигматическим лазерным пучком, создающим плоскость, сканирующую кровоток в выбранном сечении ткани. Лазер прибора при этом работает в двухимпульсном режиме, а интервал между импульсами можно варьировать в определенном диапазоне. Рассеиваемое микросферами излучение регистрируется фотоприемником, после чего подвергается компьютерной обработке с использованием корреляционных алгоритмов для определения скоростей микрочастиц в кровотоке. Использование этого метода продемонстрировало экспоненциальный характер изменения профиля скоростей в ЭГК. Пилотное исследование, рассматривающее только насыщенную плазмой область около сосудистой стенки, определило эффективную гидродинамическую толщину ЭГК порядка 0,3-0,35 мкм [32]. Полный анализ профиля скоростей по всей плоскости микрососуда с использованием действительного градиента скоростей на границе ЭГК откорректировал первоначальные данные: эффективная

толщина ЭГК в венулах составляла ~0,5 мкм, а при его деградации излучением 0,2 мкм [33].

Перспективным подходом прямой визуализации ЭГК, в том числе и *in vivo*, является использование способных взаимодействовать с фрагментами ЭГК специфичных соединений с последующей лазерной микроскопией тканевых образцов, используя конфокальную лазерную сканирующую (CLSM) и двухфотонную лазерную сканирующую микроскопию (TPLSM). В качестве маркерных флуоресцентных соединений могут выступать связывающиеся со специфичными сахарами сосудистой стенки лектины или антитела к белкам и сахарам ЭГК [34, 35]. Указанные методики микроскопии позволяют создавать пространственную реконструкцию визуализируемых объектов, что способствует последующей обработке полученных данных. Метод CLSM был использован для визуализации ЭГК на поверхности культивируемых эндотелиальных клеток [36]. Толщина ЭГК в этом исследовании составляла 2-3 мкм. Этот тип микроскопии использовался также при исследовании воздействия на структуру ЭГК ишемии/реперфузии и воспаления по изменению концентраций флуоресцентных лектинов в посткапиллярных венулах брыжейки крысы [35]. Использование метода CLSM ограничивается глубиной проникновения световых лучей в ткани (не глубже 40 мкм), что не позволяет исследовать крупные сосуды с толстой стенкой, а также использовать его на изолированных органах и клеточных культурах. Напротив, TPLSM позволяет *in vivo* изучать ткани на глубине более 1 мм, и имеет в сравнении с CLSM целый ряд дополнительных преимуществ (высокое разрешение, низкая фототоксичность), что способствует изучению ЭГК в крупных артериях. Возможности этого метода помогли визуализировать ЭГК в интактной сонной артерии мыши, толщина которой составила 3,5-5,5 мкм [37]. В настоящее время TPLSM является самой перспективной методикой для исследования функций ЭГК *in vivo* в микро- и макроциркуляторной системе мелких лабораторных животных.

В настоящее время проводятся эксперименты по разработке экспериментальных подходов неинвазивной и воспроизводимой оценки состояния ЭГК у человека. Один из разрабатываемых подходов базируется на оценке состояния гликокаликса микроциркуляторной сети в сублингвальной области человека по данным изменения размеров толщины колонки эритроцитов в капилляре после единичного прохождения лейкоцита (методике, апробированной на животных моделях) с помощью ортогональной поляризационной спектроскопии (*orthogonal polarization spectroscopy*, OPS) [38]. Полученные результаты оценивались совместно с измерениями системного объема ЭГК и показали обратную связь между наличием факторов риска ССЗ и толщиной ЭГК микроциркуляторной сети. Перспективной в этом плане является использование методики темнопольной микроскопии (*side-stream dark field imaging*, SDF) [39].

Биохимический состав и структура гликокаликса

Современные методы структурной и аналитической биохимии помогли идентифицировать входящие в ЭГК компоненты, а его общий вид был установлен различными способами визуализации (преимущественно микроскопии) и флуоресцентного маркирования [2]. Оказалось, ЭГК представляет собой высоко организованный полианионный комплекс с суммарным отрицательным зарядом, среди компонентов которого преобладают полимерные углеводы – гликозаминогликаны (ГАГ). Эти комплексные сахара связываются с поверхностью эндотелиальной клетки через ковалентное присоединение к белковым каркасным молекулам, образуя протеогликаны – синдеканы (связывают 5 цепей гепаран/хондроитинсульфата) и глипиканы (связывают 3 цепи гепаран/хондроитинсульфата) [2, 40]. ГАГ могут нековалентно связываться с другими белковыми компонентами ЭГК, гликопротеинами [41]. Эти мембранные белки содержат в своей структуре разнообразные олигосахаридные компоненты с терминальными сиаловыми кислотами, что создает на их поверхности специфические участки связывания разнообразных сигнальных молекул. Экспонированный к просвету сосуда поверхностный слой ЭГК состоит преимущественно из многочисленных растворимых компонентов, связывающихся с отрицательно заряженными компонентами через катионные участки своей структуры – растворимых протеогликанов (таких как бигликан, перлекан, декорин, версикан, мимекан), плазматических белков, ферментов и их ингибиторов, цитокинов и факторов роста, катионных аминокислот, низкомолекулярных катионов и молекул воды [1, 42, 43]. ЭГК является весьма динамичным образованием, в котором постоянно происходит замещение структурных компонентов (в первую очередь растворимых) [44-46]. Следует также учитывать, что ЭГК подвергается воздействию специфических протеаз и гликозидаз, регулирующих его плотность и функции [47]. Более того, динамические изменения параметров кровотока (например, напряжение сдвига) и действие сигнальных молекул вызывают постоянное изменение профиля экспрессии и катаболизма мембранных молекул апикальной поверхности эндотелиальных клеток, модулируя тем самым толщину ЭГК [48, 49]. Прямые методики визуализации показывают, что ЭГК преимущественно представляет самоорганизующуюся пространственную сеть различных полисахаридов [50]. Направленное ферментативное удаление любого из входящих в состав компонентов оказывает значительно воздействие на функции ЭГК, что демонстрирует значимость всех его компонентов для правильного функционирования этой структуры как целого.

Протеогликаны и гликозаминогликаны

В качестве основных опорных структур для остальных компонентов ЭГК выступают протеогликаны [2]. Они представляют собой вытянутые белковые молекулы (коровые белки), которые имеют в своей структуре несколько участков для ковалент-

Рисунок 2. Структура полимерных и сополимерных дисахаридных единиц гликозаминогликанов и их условная классификация.

	ПОЛИМЕРЫ		СОПОЛИМЕРЫ	
	[-4) GlcA (β1-3) GlcNAc (β1-)] _n		[-4) GlcA (β1-) IdOA (α1-) GlcNAc (α1-) (2-SO ₃ ⁻) (3-SO ₃ ⁻ , 6-SO ₃ ⁻)] _n	
ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНЫ	отсутствует O-сульфатирование			
	ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА		ГЕПАРИН/ГЕПАРАНСУЛЬФАТ	
	[-4) GlcA (β1-3) GalcNAc (β1-)] _n		[-4) GlcA (β1-3) GalcNAc (β1-) IdOA (α1-)] _n	
ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНЫ	(2-SO ₃ ⁻) (4-SO ₃ ⁻ , 6-SO ₃ ⁻)		(2-SO ₃ ⁻) (4-SO ₃ ⁻ , 6-SO ₃ ⁻)	
	ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ		ДЕРМАТАНСУЛЬФАТ	

ного присоединения цепей ГАГ. Последние являются полимерными, отрицательно заряженными сахарами, обладающими линейной структурой, составленной из простой последовательности соединенных гликозидной связью дисахаридов [51, 52] (Рис. 2). Эти дисахариды представлены уроновой кислотой (D-глюкуроновой или L-идуроновой кислотой), соединенной с гексозамином (D-галактозамином или D-глюкозамином). Почти все ГАГ (за исключением гиалуронана) имеют в своей структуре модифицированные группы [53, 54].

Существует множество ферментов, которые после посттрансляционной сборки полисахаридных цепей на коровом белке протеогликана проводят сульфатирование и ацетилирование функциональных группировок ГАГ, при этом в каждом случае степень модификации может варьировать в широких пределах [55-57]. Как правило, на одну дисахаридную единицу может приходиться от 16 до 48 различных типов сульфатирования [58]. Принимая во внимание тот факт, что функциональные домены ГАГ обычно состоят из 5-10 дисахаридных единиц, максимальное теоретическое число участков сульфатирования на гексасахаридном фрагменте может достигать 4000 SO₄-групп, что создает громадную совокупность функционально гетерогенных соединений [50]. Сульфатированные ГАГ образуют вытянутые спирали, конформация которых зависит от локального характера сульфатирования, эластичности связанных моносахаридов и силы внутримолекулярных электростатических взаимодействий [59]. Локальные параметры среды (ионная сила и pH) оказывают сильное влияние на характер растяжимости спирали ГАГ [60]. Наибольшая растяжимость (80% от линейной длины) может достигаться при физиологических параметрах среды, в результате чего цепь ГАГ, состоящая из 100 дисахаридных единиц, может растягиваться на 80 нм.

Наличие в структурной дисахаридной единице ГАГ того или иного компонента, а также геометрия гликозидной связи (α или β) между этими компонентами и степень модификации, определяет классификацию ГАГ. Существует пять типов подобных полимеров: гепарин/гепарансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератан-сульфат и гиалуронан (гиалуроновая кислота) [55]. При этом они могут подразделяться по тому или иному параметру на соответствующие подгруппы. К примеру, различие может основываться на природе входящего в структуру ГАГ аминоксахара: содержащие галактозамин хондроитинсульфат и дерматансульфат поэтому называются галактозаминогликанами, а содержащие глюкозамин гепарин/гепарансульфат и гиалуронан – глюкозаминогликаны (Рис. 2). Стоит также отметить, что дерматансульфат часто рассматривается как обособленный тип ГАГ, тогда как в действительности он является модифицированной молекулой хондроитинсульфата (класс Б). Различие между двумя классами состоит в эпимеризации глюконовой кислоты в идуроновую, что изменяет свойства дерматансульфата [52].

Каждый тип ГАГ достаточно хорошо охарактеризован как структурно, так и функционально. Эти полимерные сахара в избытке представлены во внеклеточном матриксе тканей позвоночных и принимают участие во множестве физиологических и патофизиологических процессов. Все ГАГ могут участвовать в передаче клеточных сигналов, эмбриогенезе, ангиогенезе, развитии и метастазировании опухолей, аксональном росте [61-66]. Важным свойством гепарина и некоторых типов гепаран-сульфата является регуляция свертываемости крови [67]. Некоторые гепарансульфаты с определенным типом сульфатирования полностью лишаются антикоагулянтных свойств, но приобретают способность подавлять рост опухолей [68, 69]. Так как сульфатированные ГАГ входят в состав разнообразных внеклеточных белковых скоплений, амилоидов, они участвуют в таких заболеваниях, как амилоидные дистрофии, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет 2 типа, болезнь Паркинсона и прионные инфекции [70, 71]. Воспалительные процессы также не обходятся без этих полимеров, выполняющих функцию вспомогательных соединений для реализации иммунного ответа организма [72]. Благодаря способности взаимодействовать с клеточной поверхностью некоторых патогенных микроорганизмов, ГАГ могут способствовать микробному патогенезу и инвазии [73].

Все ГАГ за исключением гиалуронана связаны с коровыми белками протеогликанов ковалентной связью [51]. Эта связь представляет собой специфичную трисахаридную структуру, состоящую из двух остатков галактозы (Gal) и остатка ксилозы (Xyl), которая присоединена к сериновому остатку корового белка через О-гликозидную связь. Некоторые формы кератансульфата связываются с коровым белком через N-аспарагин [52]. Связывание

ГАГ с протеогликанами стабилизирует структуру полимерных сахаров.

Мембранные протеогликианы

Практически все типы клеток продуцируют разнообразные протеогликианы (ПГ), а затем переносят их во внеклеточный матрикс, экспонируют на своей поверхности или накапливают в секреторных гранулах [74]. Эти белковые молекулы могут различаться по ряду параметров, таких как размер полипептидной цепи, характер связывания с мембраной эндотелиальной клетки, количество участков присоединения ГАГ. На основании этих характеристик молекулы ПГ объединяются в несколько групп. ПГ, входящие в группы синдеканов (белки с трансмембранным доменом, 4 подтипа) и глипиканов (мембранные белки, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом, 6 подтипов), присоединены к клеточной мембране, тогда как другие ПГ (бигликан, мимикан, перлекан, версикан и декорин) являются растворимыми белками и связаны с ЭГК благодаря своим ионогенным структурным группам [75]. ПГ не обладают способностью связывать какой-то определенный тип ГАГ, обычно те или иные группы ПГ содержат несколько типов углеводных полимеров. На соотношение содержания разных типов ГАГ могут влиять различные факторы в процессе синтеза структуры ПГ.

Наиболее распространенными ПГ сосудистой стенки являются содержащие гепаран-сульфат ПГ, составляющие 50-90% от общего количества ПГ [1, 76]. Это значение существенно варьирует в указанном интервале из-за действия разнообразных стимулов, оказывающих влияние на эндотелиальную клетку. Менее распространенным на поверхности ЭГК является хондроитинсульфат различных видов, при этом традиционно указывается, что соотношение между гепарансульфатом и хондроитинсульфатом в ЭГК составляет 4:1 [77, 78]. Распространение и функции в сосудистой сети ПГ кератан-сульфата до их пор не выяснены.

ПГ клеточной поверхности представлены в первую очередь тремя подтипами синдекана: синдекан-1 (33 кДа), -2 (22 кДа) и -4 (22 кДа) [79]. Эти коровые белки имеют в своей структуре короткий цитоплазматический домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, который содержит несколько участков присоединения ГАГ гепаран- и хондроитинсульфатов [80, 81]. Синдекан-1 во внеклеточном домене около клеточной мембраны имеет несколько участков присоединения цепей хондроитинсульфата и три участка присоединения цепей гепарансульфата ближе к терминальному N-концу на удалении от мембраны, тогда как синдеканы-2 и -4 таких участков связывания хондроитинсульфата не имеют [82]. Синдеканы обладают различными профилями экспрессии в сосудистой стенке, зависящими от ряда факторов. Так, действие фактора некроза опухолей α (TNF- α) увеличивает уровень эндотелиальной экспрессии синдекана-2 и снижает экспрес-

ПРОСВЕТ СОСУДА

слой растворимых протеогликанов

SOD

CD44

Синдкан-1

Кавеола

Липидные рафты с глипиканом-1

UDP-GlcNAc
UDP-GlcA

Гиалуронан синтеза (HAS)

Синдкан-4

каналы транспорта Na⁺, K⁺, Ca²⁺, L-аргинина, моносахаридов

eNOS

ЦИТОПЛАЗМА

F-актиновый цитоскелет

F-актиновый цитоскелет

гиалуронат

гепарансульфат

хондроитинсульфат

дерматансульфат

протеиновая цепь

олигосахарид

белки кровотока

профиля скоростей кровотока, так и сами представители семейства синдеканов [48, 83]. Основным свойством этих трансмембранных молекул является способность передавать сигналы из внеклеточно-

го окружения в клетку. Связывание специфических лигандов с гепарансульфатами на клеточной поверхности приводит к активации внутриклеточных факторов, например, киназных доменов (c-Src), PDZ-домена или связанных с этими участками структурных клеточных белков (тубулин, динамин или α -актинин) [79]. Активация этих факторов вызывает каскад процессов, приводящих к изменению связывающих свойств внеклеточных фрагментов ПГ и к реорганизации цитоскелета.

Состоящие из шести подтипов глипиканы на поверхности эндотелия представлены только глипиканом-1 (64 кДа) [80]. Его участки связывания (3 или 4), несущие преимущественно цепи гепарансульфата, находятся около плазматической мембраны. N-терминальная часть этого ПГ содержит множество цистеиновых остатков и из-за этого принимает глобулярную форму, что отличает эти домены от внеклеточных доменов синдеканов с вытянутой формой. Глипиканы не являются трансмембранными белками: их молекулы связаны с мембраной через гликозилфосфатидилинозитол и локализуются преимущественно в местах скопления холестерина и сфинголипидов [84, 85]. Подобные участки мембраны принимают участие в процессах везикулярного транспорта и передачи клеточных сигналов благодаря интеграции этих участков с белком кавеолином-1, образующим в участках мембраны, связанных с цитоскелетом, углубления (Рис. 3), и присутствию в них разнообразных сигнальных молекул, например, эндотелиальной NO-синтазы [86].

Растворимые протеоглики

Как с апикальной, так и с дорзальной стороны эндотелиальных клеток и на гладкомышечных клетках крупных сосудов также секретируется крупный растворимый ПГ перлекан (450 кДа), состоящий из пяти доменов, один из которых имеет несколько участков присоединения гепаран- и хондроитинсульфата [87]. Этот ПГ участвует в формировании внеклеточного субэндотелиального матрикса и базальной мембраны сосудов [50, 88].

Другим важным компонентом гликокаликса является гиалуронан, представляющий собой самый крупный ГАГ (до 104 кДа) [56]. Он является единственным ГАГ, который не связывается ковалентно с коровыми белками ПГ, а фиксируется в ЭГК через взаимодействия со специфическими рецепторами клеточной поверхности, такими как гликопротеин CD44, RHAMM (рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности, CD168 на клеточной поверхности) и LYVE-1 (рецептор гиалуронана, экспонированный на поверхности эндотелия лимфатических сосудов) [89, 90]. Более того, многие белки с разнообразными активностями (STABILIN-1/2, TSG-6, CD38, CDC37, ITI, SPACR, объединяемых в группу так называемых белков гиаладгеринов) обладают способными связывать гиалуронан

структурными мотивами, что обуславливает участие этого полимера во многих процессах передачи клеточных сигналов [74].

Биосинтез протеогликанов и гликозаминогликанов

Содержащие гепарансульфат и хондроитинсульфат ПГ синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи клеток эндотелия [55, 56, 74]. Напротив, гиалуронан синтезируется на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны клетки группой ферментов под названием гиалуронан синтазы, существенно отличающихся от остальных гликозилтрансфераз [91]. У млекопитающих существует три типа подобных ферментов, структура которых представляет собой комплекс трансмембранных доменов, связанных друг с другом крупными цитоплазматическими петлями. Расположенный у цитоплазматической поверхности мембраны каталитический центр этих ферментов с двойной активностью переносит и связывает фрагменты N-ацетилглюкозамина и глюкуроновую кислоту с необходимыми субстратами (нуклеотидных сахаров) [92]. Растущая полимерная цепь гиалуронана продавливается через мембрану во внеклеточное пространство, где фиксируется специфическими рецепторами клеточной поверхности [93].

Гликопротеины

Некоторые гликопротеины могут наравне с ПГ участвовать в организации структуры ЭГК и обеспечивать его связь с клеточной мембраной эндотелия [41, 50]. Они представляют собой закрепленные в мембране белки, к внеклеточной части которых присоединены короткие разветвленные олигосахариды (2-15 сахаридных остатков). Сахаридная цепь этих остатков завершается сиаловыми кислотами, девятиуглеродными моносахаридами, вносящими вклад в отрицательный заряд ЭГК при их ионизации в области физиологических значений pH. Основными классами гликопротеинов являются молекулы клеточной адгезии и рецепторы межклеточной сигнализации, а также компоненты систем фибринолиза и коагуляции [94, 95]. Синтез и экспонирование этих гликопротеинов на клетках эндотелия зависит от многих факторов, приводящих к активации при стимулировании эндотелия.

Основными белковыми молекулами клеточной стенки, относящимися к классу гликопротеинов, являются интегрины, селектины и суперсемейство иммуноглобулинов [96-98]. Гликопротеины семейства селектинов представляют собой трансмембранные белки с цитоплазматическим участком и несколькими внеклеточными доменами, один из которых по своей структуре сходен с эпидермальным фактором роста (EGF-домен), а другой, N-терминальный, является связывающей сахаридные компоненты лектиновой структурой [99, 100]. Также в структуре



внеклеточной части селектинов могут содержаться модули, сходные по структуре с фрагментами белков комплемента. Существует 3 типа селектинов: E, P и L [101]. E-селектины экспонируются на эндотелиальных клетках, а L-селектины – на лейкоцитах. P-селектины могут быть представлены как на эндотелиальных клетках, так и на тромбоцитах. E-селектины эндотелиальных клеток сразу же после рибосомальной трансляции и посттрансляционных модификаций в эндоплазматическом ретикулуме и компартаментах аппарата Гольджи непосредственно экспонируются на мембране клетки, тогда как P-селектины после синтеза хранятся в тельцах Вейбеля-Палладе. При воспалительном отклике на тканевое повреждение действие ряда медиаторов (таких как гистамин, тромбин, активные формы кислорода, ЛНП) вызывают мобилизацию и транслокацию P-селектина на клеточную поверхность, где он присутствующее короткое время, после чего переводится в лизосомальные гранулы и аппарат Гольджи, а оттуда вновь поступает на хранение в тельца Вейбеля-Палладе [102, 103]. Стимуляция эндотелия эндотоксинами и цитокинами (IL-1 β , TNF- α) стимулирует экспрессию E-селектина и дополнительное экспонирование P-селектина на поверхности эндотелиальных клеток [104]. Основной функцией селектинов эндотелия является адгезия лейкоцитов к поверхности сосудистой стенки.

Упомянутые выше интегрины представляют собой рецепторы клеточной поверхности, способствующие как межклеточной адгезии, так и связи клетки с компонентами внеклеточного матрикса и базальными мембранами. Эти гетеродимерные молекулы состоят из двух нековалентно связанных друг с другом трансмембранных субъединиц (α и β). Существует 18 типов α -субъединиц и 8 типов β -субъединиц, комбинация которых приводит к появлению различных типов этих белков [105]. В настоящее время охарактеризовано 24 типа интегринов. Эти гликопротеины экспрессируются множеством типов клеток, таких как фибробласты, клетки эпителия и эндотелия, лейкоциты и тромбоциты. На апикальной стороне эндотелиальных клеток экспонируется интегрин $\alpha v \beta 3$, обеспечивающий контакт этих клеток с тромбоцитами, тогда как с дорсальной стороны интегрины $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, и $\alpha 6 \beta 1$ взаимодействуют с лигандами внеклеточного матрикса (коллагенами, ламинином, фибронектином и витронектином), при этом интегрины группируются в определенных участках, называемых фокальными контактами [96, 106]. Внутриклеточные домены интегринов через группу молекул цитоплазмы (таких как талин, винкулин, паксиллин и α -актинин) связываются с актиновым цитоскелетом. Благодаря подобным контактам, а также связи внутриклеточных доменов с группой протеинкиназ, интегрины играют важную роль в передаче клеточных сигналов и участвуют в таких ключевых процессах как клеточная дифференциация, рост, пролиферация, миграция и апоптоз [96].

Гликопротеины суперсемейства иммуноглобулинов являются трансмембранными белками, внеклеточные домены которых содержат различное количество иммуно-глобулиновых фрагментов. На эндотелии сосудистой стенки соединения этого типа представлены молекулами клеточной адгезии ICAM-1 и -2, молекулой адгезии клеток сосуда VCAM-1 и молекулой адгезии тромбоцитов к эндотелию PECAM-1. Молекулы ICAM-1 (CD54), -2 (CD102) и VCAM-1 обеспечивают адгезию нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и лимфоцитов к активированному эндотелию через связывание с лейкоцитарными интегринными LFA-1, Mac-1, 4 1 для экстравазации клеток иммунной системы в воспаленные ткани [101]. Эти гликопротеины секретируются клетками эндотелия, моноцитами и лимфоцитами, при этом ICAM-2 является конститутивным рецептором, тогда как ICAM-1 экспрессируется клетками после их активации цитокинами (IL-1, TNF-, IFN-). Экспрессия VCAM-1 и ICAM-1 активируется действием цитокинов [107]. Постоянно присутствующий на эндотелии гликопротеин PECAM-1 (CD31) наряду с адгезией иммунных и опухолевых клеток также обеспечивает связывание тромбоцитов с сосудистой стенкой [108].

Помимо описанных выше соединений в составе гликокаликса могут присутствовать другие типы гликопротеинов, принимающих участие в процессах поддержания сосудистого гомеостаза, фибринолиза и коагуляции крови. В качестве примера подобных белков можно привести входящий в мембрану эндотелия гликопротеин тромбомодулин [109]. Этот белок, связывая тромбин и удаляя его из системы свертывания крови, ускоряет процесс активации протеина C, разрушающего ряд факторов коагуляции (VIIIa и Va) и ингибирующего образование тромбина, что определяет важную антикоагулянтную функцию тромбомодулина. Другим примером является экспрессирующийся на эндотелиальных клетках и тромбоцитах гликопротеиновый макрокомплекс Ib-IX-V, состоящий из четырех трансмембранных компонентов [110]. Этот комплекс связывает фактор Виллебранда и P-селектин, способствуя активации тромбоцитов и их адгезии к субэндотелию при повреждении сосудистой стенки [111, 112].

Общая структура эндотелиального гликокаликса

Описанные мембранные ПГ и гликопротеины образуют квазипериодическую трехмерную сеть, организирующую специфическую ультраструктуру на апикальной поверхности эндотелия. Волокна этой сети, представляющие собой коровые белки ПГ, имеют диаметр порядка 10-12 нм и расположены друг от друга на расстоянии ~20 нм [113]. Полученные при изучении изготовленных методом криоскальвания поперечных сосудистых срезов данные и общие результаты микроскопии ЭГК продемонстрировали существование центров фиксации коровых белков

на мембране и соединения этих центров со структурами цитоскелета. Исходящие из этих центров коровые белки образуют квазигексагональную ячеистую структуру (Рис. 1) с шагом решетки между центрами фиксации порядка 100 нм [23, 25, 113]. Подобная структура согласуется с концепцией того, что ЭГК представляет собой волоконную матрицу, выполняющую функцию внеклеточного молекулярного фильтра. На основании данных о существовании подобной ультраструктуры была созданная математическая модель, с помощью которой прогнозировались механизмы процесса фильтрации через ЭГК, расчет сопротивления ЭГК к различным скоростям кровотока и его передачи к кортикальному цитоскелету [114].

С помощью электронной микроскопии было показано, что ЭГК может быть организован в два слоя: внутренний слой толщиной в несколько десятков нанометров у поверхности мембраны клеток эндотелия и внешний слой, состоящий из коровых белков и простирающийся на 500 нм и выше [23] (Рис. 3). В этот слой входят растворимые компоненты, такие как белки кровотока и соединения, экспрессируемые эндотелиальными клетками. Помимо структурной роли они реализуют некоторые важные функции гликокаликса. Так, белки плазмы α -1-гликопротеид (орозомукоид) и альбумин, абсорбируясь на внешней поверхности ЭГК, участвуют в создании селективного заряженного барьера для избирательной тканевой фильтрации [14, 115]. На границе раздела этих слоев присутствует гиалуронан, связанный своими рецепторами с клеточной поверхностью и цепями хондроитинсульфата ПГ. Возможность расположения гиалуронана в глубине ЭГК была показана в нескольких экспериментах с использованием различных гликолитических ферментов. Длительная обработка (в течение 2 часов) гиалуронидазой, разлагающим гиалуронан ферментом, вызывает незначительное сокращение структуры ЭГК, тогда как кратковременное использование фермента гепариназы, срезающего гепарансульфат с его ПГ, приводит к существенному изменению структуры ЭГК [34, 116]. Эти данные косвенно указывают на расположение гиалуронана внутри ЭГК около мембраны эндотелиальных клеток и экранирование его ПГ (Рис. 3). Благодаря своим вязкоэластичным свойствам и способностью к агрегации с образованием стабильных комплексов,

гиалуронан создает гелеподобную подложку и стабилизирует вытянутые структуры ПГ и остальные ГАГ [90]. ПГ и гликопротеины за счет своих сахаридных компонентов, вероятно, также поддерживают целостность структуры ЭГК, взаимодействуя с соседними коровыми белками через ГАГ-цепи [117]. Эти взаимодействия скорее всего носят электростатический характер, однако возможно и существование белковых структур, ковалентно связанных ГАГ друг с другом, например, в интер-альфа-трипсиновом ингибиторе [118]. Полагают, что проницаемость ЭГК определяется гиалуронаном, а его объем регулируется ПГ [119, 120].

Заключение

Несмотря на то, что концепция поверхностного слоя эндотелия была сформулирована в 60-х годах прошлого века, доказательной методологической базы того времени было не достаточно для определения общей структуры и точного молекулярного состава ЭГК. Эти задачи были в значительной мере разрешены благодаря усовершенствованию предшествующих микроскопии процедур фиксации и окрашивания тканевых препаратов, а также разработке изящных методик прижизненной визуализации ЭГК в системе микроциркуляции животных. Используемые методы показали, что ЭГК представляет собой достаточно крупную и организованную молекулярную структуру, покрывающую люминальную поверхность эндотелиальных клеток всей сердечно-сосудистой системы. Эта структура представляет собой организованный комплекс мембрано-связанных молекул с уникальным набором биологических функций, в состав которых входят связанные с ПГ сульфатированные ГАГ, гиалуронан, гликопротеины и белки плазмы. Существование подобной структуры на стратегическом участке взаимодействия циркулирующей крови с тканью подразумевает наличие у ЭГК ряда специфических функций, регулирующих процессы сосудистого метаболизма.

Гранты

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке грантами РФФИ 07-04-12057-офи, 09-04-00023 и Минздравсоцразвития России.

Список литературы

1. Pries AR, Secomb T.W., Gaebtgens P. The endothelial surface layer. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 2000; 440: 653-666.
2. Weinbaum S., Tarbell J.M., Damiano E.R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9: 121-167.
3. Scott J.E. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat* 1995; 187: 259-269.
4. Danielli J.F. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol* 1940; 98(1): 109-129.
5. Chambers R., Zweifach B.W. Intercellular Cement and Capillary Permeability. *Physiol Rev* 1947; 27: 436-463.
6. Copley A.L. Hemorheological aspects of the endothelium-plasma interface. *Microvasc Res* 1974; 8: 192-212.
7. Luft J.H. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 1966; 25: 1773-1783.



8. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol* 1979; 237: H481-H490.
9. Pries AR, Secomb T.W., Gessner T. et al. Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res* 1994; 75: 904-915.
10. Desjardins C, Duling BR. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol* 1990; 258(3, Pt 2): H647-H654.
11. Pries AR, Secomb T.W., Jacobs H. et al. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am J Physiol* 1997; 273 (5, Pt 2): H2272-H2279.
12. Baldwin AL, Winlove C.P. Effects of perfusate composition on binding of ruthenium red and gold colloid to glycocalyx of rabbit aortic endothelium. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 259-266.
13. Clough G, Moffitt H. Immunoperoxidase labeling of albumin at the endothelial cell surface of frog mesenteric microvessels. *Int J Microcirc Clin Exp* 1992; 11: 345-358.
14. Adamson R.H., Clough G. Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels. *J Physiol* 1992; 445: 473-486.
15. Ueda A, Shimomura M, Ikeda M. et al. Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(5): H2287-H2294.
16. Damiano E.R., Duling B.R., Ley K, Skalak T.C. Axisymmetric pressure-driven flow of rigid pellets through a cylindrical tube lined with deformable porous wall layer. *J Fluid Mech* 1996; 314: 163-189.
17. Damiano E.R. The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. *Microvasc Res* 1998; 55: 77-91.
18. Secomb T.W., Hsu R, Pries AR. A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries. *Am J Physiol* 1998; 274(3, Pt 2): H1016-H1022.
19. Secomb T.W., Hsu R, Pries AR. Motion of red blood cells in a capillary with an endothelial surface layer: effect of flow velocity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H629-H636.
20. van den Berg B.M., Vink H, Spaan JA. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* 2003; 92: 592-594.
21. Sims DE, Horne M.M. Non-aqueous fixative preserves macromolecules on the endothelial cell surface: an in situ study. *Eur J Morphol* 1993; 31: 251-255.
22. Hjalmarsson C., Johansson B.R., Haraldsson B. Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvasc Res* 2004; 67: 9-17.
23. Rostgaard J., Quortrup K. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc Res* 1997; 53: 1-13.
24. Rostgaard J., Quortrup K. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries—site of the filtration barrier? *Cells Tissues Organs* 2002; 170: 132-138.
25. Clough G, Michel C.C. Quantitative comparisons of hydraulic permeability and endothelial intercellular cleft dimensions in single frog capillaries. *J Physiol* 1988; 405: 563-576.
26. Squire J.M., Chew M., Nneji G. et al. Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *J Struct Biol* 2001; 136: 239-255.
27. Weinbaum S., Zhang X., Han Y. et al. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7988-7995.
28. Zhang X., Curry F.R., Weinbaum S. Mechanism of osmotic flow in a periodic fiber array. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H844-H852.
29. Vink H, Duling B.R. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996; 79: 581-589.
30. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1541-1547.
31. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; 101: 1500-1502.
32. Smith M.L., Long D.S., Damiano E.R., Ley K. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophys J* 2003; 85(1): 637-645.
33. Damiano E.R., Long D.S., Smith M.L. Estimation of viscosity profiles using velocimetry data from parallel flows of linearly viscous fluids. *J Fluid Mech* 2004; 512: 1-19.
34. Florian J.A., Kosky J.R., Ainslie K. et al. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 2003; 93: e136-e142.
35. Mulivor A.W., Lipowsky H.H. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1672-H1680.
36. Barker A.L., Konopatskaya O., Neal C.R. et al. Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. *Phys Chem Chem Phys* 2004; 6: 1006-1011.
37. Megens R.T., Reitsma S., Schiffrers P.H. et al. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J Vasc Res* 2007; 44: 87-98.
38. Nieuwendorp M., Meuwese M.C., Mooij H.L. et al. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol* 2008; 104: 845-852.
39. den Uil C.A., Klijn E., Lagrand W.K. et al. The microcirculation in health and critical disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2008; 51:

161-170.

40. Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem Biol* 2005; 12: 267-77.
41. Lawrenson J.G., Cassella J.P., Hayes A.J. et al. Endothelial glycoconjugates: a comparative lectin study of the brain, retina and myocardium. *J Anat* 2000; 196 (Pt 1): 55-60.
42. Bernfield M., Gütte M., Park P.W. et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 729-777.
43. Osterloh K., Ewert U., Pries A.R. Interaction of albumin with the endothelial cell surface. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H398-H405.
44. Hileman R.E., Fromm J.R., Weiler J.M., Linhardt R.J. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays* 1998; 20: 156-167.
45. McGee M.P., Liang J. Regulation of glycosaminoglycan function by osmotic potentials. Measurement of water transfer during antithrombin activation by heparin. *J Biol Chem* 2001; 276: 49275-49282.
46. Coombe D.R., Kett W.C. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 410-424.
47. Lipowsky H.H. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation* 2005; 12: 5-15.
48. Aisaka T., Mitsumata M., Kawasumi M. et al. Effects of shear stress on glycosaminoglycan synthesis in vascular endothelial cells. *Ann NY Acad Sci* 1995; 748: 543-554.
49. Obunike J.C., Pillarisetti S., Paka L. et al. The heparin-binding proteins apolipoprotein E and lipoprotein lipase enhance cellular proteoglycan production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 111-118.
50. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454: 345-359.
51. Taylor K.R., Gallo R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 2006; 20: 9-22.
52. Gandhi N.S., Mancera R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008; 72: 455-482.
53. Jackson R.L., Busch S.J., Cardin A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 71: 481-539.
54. Oobira A., Wight T.N., Bornstein P. Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture. *J Biol Chem* 1983; 258: 2014-2021.
55. Sasisekharan R., Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 626-631.
56. Sugabara K., Kitagawa H. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 2002; 54: 163-175.
57. Silbert J.E., Sugumaran G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 2002; 54: 177-186.
58. Kusche-Gullberg M., Kjellin L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13: 605-611.
59. Almond A., Sheehan J.K. Glycosaminoglycan conformation: do aqueous molecular dynamics simulations agree with x-ray fiber diffraction? *Glycobiology* 2000; 10: 329-338.
60. Seog J., Dean D., Rolaufts B. et al. Nanomechanics of opposing glycosaminoglycan macromolecules. *J Biomech* 2005; 38: 1789-1797.
61. Laurent T.C., Laurent U.B., Fraser J.R. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: A1-A7.
62. Toole B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 1997; 242: 35-40.
63. Iozzo R.V., San Antonio J.D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 2001; 108: 349-355.
64. Liu D., Sbriver Z., Qi Y., Venkataraman G., Sasisekharan R. Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28: 67-78.
65. Timar J., Lapis K., Dudis J. et al. Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer* 2002; 12: 173-186.
66. Sanderson R.D. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 89-98.
67. Liu J., Pedersen L.C. Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 74: 263-272.
68. Filmus J. Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* 2001; 11(3): 19R-23R.
69. Casu B., Vlodavsky I., Sanderson R.D. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2008; 36: 195-203.
70. Snow A.D., Willmer J., Kisilevsky R. Sulfated glycosaminoglycans: a common constituent of all amyloids? *Lab Invest* 1987; 56: 120-123.
71. Kisilevsky R., Ancsin J.B., Szarek W.A., Petanceska S. Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications. *Amyloid* 2007; 14: 21-32.
72. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourbargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678-689.
73. Rostand K.S., Esko J.D. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* 1997; 65: 1-8.



74. Esko J.F., Kimata K., Lindahl U. in: *Essentials of Glycobiology, Second Edition*, edit. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Hart G.W., Etzler M.E., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009; 784: 229-230.
75. Broekhuizen L.N., Mooij H.L., Kastelein J.J. et al. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 57-62.
76. Ibrcke N.S., Wrenshall L.E., Lindman B.J., Platt J.L. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today* 1993; 14: 500-505.
77. Mulivor A.W., Lipowsky H.H. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1672-H1680.
78. Rapraeger A., Jalkanen M., Endo E. et al. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1985; 260: 11046-11052.
79. Tkachenko E., Rhodes J.M., Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 2005; 96: 488-500.
80. Rosenberg R.D., Shworak N.W., Liu J. et al. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest* 1997; 99: 2062-2070.
81. Halden Y., Reik A., Atzenhofer W. et al. Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. *Biochem J* 2004; 377: 533-538.
82. Kokenyesi R., Bernfield M. Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* 1994; 269: 12304-12309.
83. Gallo R.L. Proteoglycans and cutaneous vascular defense and repair. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 55-60.
84. Fransson L.A., Belting M., Cheng F. et al. Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1016-1024.
85. Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 145-151.
86. van Deurs B., Roepstorff K., Hommelgaard A.M., Sandvig K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 92-100.
87. Segev A., Nili N., Strauss B.H. The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 603-610.
88. Wight T.N. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front Biosci* 2008; 13: 4933-4937.
89. Jackson D.G. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol Rev* 2009; 230: 216-231.
90. Evanko S.P., Tammi M.I., Tammi R.H., Wight T.N. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 1351-1365.
91. Itano N., Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 2002; 54: 195-199.
92. Weigel P.H., DeAngelis P.L. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem* 2007; 282: 36777-36781.
93. Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 435-461.
94. Levi M., van der Poll T., Buller H.R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004; 109: 2698-2704.
95. Levi M., Keller T.T., van Gorp E., ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 26-39.
96. Røegg C., Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1135-1157.
97. Barthel S.R., Gavino J.D., Descheny L., Dimitroff C.J. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 1473-1491.
98. Galkina E., Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2292-2301.
99. Gibson R.M., Kansas G.S., Tedder T.F. et al. Lectin and epidermal growth factor domains of P-selectin at physiologic density are the recognition unit for leukocyte binding. *Blood* 1995; 85: 151-158.
100. Kansas G.S., Saunders K.B., Ley K. et al. A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol* 1994; 124: 609-618.
101. Zarbock A., Ley K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 2009; 16: 31-42.
102. Dole V.S., Bergmeier W., Mitchell H.A. et al. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* 2005; 106: 2334-2339.
103. Sperandio M., Ley K. The physiology and pathophysiology of P-selectin. *Mod Asp Immunobiol* 2005; 15: 24-26.
104. Jung U., Ley K. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation* 1997; 4: 311-319.
105. Xiong J.P., Steble T., Goodman S.L., Arnaout M.A. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1642-1654.
106. Bombeli T., Schwartz B.R., Harlan J.M. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α 5 β 1 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998; 187: 329-339.
107. Møller A.M., Hermanns M.I., Cronen C., Kirkpatrick C.J. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2002; 73: 171-180.
108. Woodfin A., Voisin M.B., Noursbargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
109. Tanaka K.A., Key N.S., Levy J.H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009; 108: 1433-1446.
110. Berndt M.C., Shen Y., Doppeide S.M. et al. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 2001; 86:

178-188.

111. Ruggeri Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1335-1342.112. Wu G, Essex D.W., Meloni F.J. et al. Human endothelial cells in culture and in vivo express on their surface all four components of the glycoprotein Ib/IX/V complex. *Blood* 1997; 90: 2660-2669.113. tion for molecular filtering? *J Struct Biol* 2001; 136: 239-255.

114. 2003; 100: 7988-7995.

115. Pt2): H1645-H1654.

116. Pt2): H508-H514.

117. 2007; 17: 101-105.

118.

119. 82.

120. *Heart Circ Physiol* 2000; 278: H285-H289.

-Squire J.M., Chew M.

Weinbaum S., Zhan

Huxley V.H., Curry

Henry C.B., Duling

Van Teeffelen J.W., Bra

Fries E., Kaczmarczyk A. In

Platts S.H., Duling

Vink H., Duling B.R. Ca