

Функции и состояние эндотелиального гликокаликса в норме и патологии

Максименко А.В., Турашев А.Д.
ФГУ РКНИК МЗиСР РФ, Москва

Абстракт

В норме на поверхности сосудистого эндотелия присутствует сложная многокомпонентная система, называемая гликокаликсом. Его структура 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 метаболизм кровотока. В условиях патологии происходит полная или частичная потеря этой структуры, что приводит к нарушению целостности сосудистой стенки и изменению ее функций. В настоящем обзоре рассматриваются функции эндотелиального гликокаликса, его участие в регуляции сосудистой проницаемости; передаче и преобразовании напряжения сдвига кровотока в эндотелий; регуляции молекулярного микроокружения эндотелия и его взаимодействия с циркулирующими клетками кровотока, а также участие гликокаликса в развитии сердечно-сосудистой патологии.

Ключевые слова: эндотелий, гликокаликс, сосудистая проницаемость, напряжение сдвига кровотока, межклеточные взаимодействия, гипергликемия, ишемия/реперфузия, атеросклероз.

Functions and state of endothelial glycocalyx in the norm and pathology conditions

Maksimenko A.V., Turashev A.D.
Russian Cardiology Research Complex, Moscow

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. Complete or partial loss of this structure in pathological conditions leads to inconsistencies in the vascular wall and changes its functions. In this review we considered functions of endothelial glycocalyx: its involvement in the regulation of vascular permeability, transduction and transformation by the shear stress of blood flow on endothelium, the molecular regulation of glycocalyx microenvironment and its interaction with circulating blood cells.

Key words: endothelium, glycocalyx, vascular permeability, shear stress, cell-cell interactions, hyperglycemia, ischemia/reperfusion, atherosclerosis.

Эндотелий выполняет важную роль в регуляции сосудистого гомеостаза, представляя собой непосредственную зону контакта между циркулирующей в организме кровью и прилегающими к сосудистой стенке тканями. Помимо того, что через него происходит обмен нутриентами и продуктами жизнедеятельности тканей, клетки эндотелия находятся в динамическом взаимодействии с гормональными и клеточными медиаторами, берущими начало в кровотоке и сосудистой стенке [1]. Стратегическое расположение эндотелиального гликокаликса (ЭГК) на границе взаимодействия кровотока и эндотелия подразумевает участие этой структуры в широком спектре процессов функционирования сосудистой системы, как в условиях нормы, так и при патологии [2]. Основными функциями ЭГК в норме являются: регуляция сосудистого гомеостаза и тонуса, поддержание интерстициального жидкостного равновесия и контроль взаимодействия

клеток крови и сигнальных соединений с сосудистой стенкой. Каждая из этих функций рассматривается далее более подробно.

Эндотелиальный гликокаликс как регулятор сосудистой проницаемости

Благодаря своей специфической ячеистой структуре и суммарному отрицательному заряду, ЭГК может выступать в роли селективного молекулярного сита, обеспечивающего избирательную фильтрацию компонентов плазмы крови и регулирующего сосудистую проницаемость [3, 4]. ЭГК является проницаемым для низкомолекулярных соединений (молекул воды, ионов и небольших гидрофильных веществ), тогда как в отношении высокомолекулярных соединений он демонстрирует избирательную проницаемость, в том числе зависящую от заряда макросоединения. Это свой-

ство ЭГК обнаружилось при изучении проницаемости артериол брыжейки крысы для флуоресцентно меченых декстранов с различным молекулярным весом [5]. Избирательная селективность ЭГК обеспечивает одинаковую проницаемость для белков плазмы в капиллярах с эндотелиальным слоем, как фенестрированного, так и непрерывного типа, несмотря на различия в коэффициентах фильтрации и ультраструктуры эндотелиального слоя разных типов [6]. Ферментативное удаление ряда компонентов ЭГК приводит к увеличению сосудистой проницаемости для макромолекул кровотока (преимущественно белков плазмы, например, альбумина), результатом чего становится тканевый отек [7, 8].

Благодаря селективной фильтрации макромолекул, ЭГК определяет происходящий на уровне капилляров обмен жидкостью между тканью и сосудистой сетью [9]. По классическим представлениям, общие барьерные свойства микрососудов при фильтрации жидкости определяются разницей между гидравлическими и коллоидно-осмотическими давлениями в просвете сосуда и в прилежащей ткани, а также гидравлической проводимостью сосудистой стенки (уравнение Старлинга-Лэндиса) [10]. При этом постоянная фильтрация жидкости начинается на артериальном конце микрососудистого сегмента, а реабсорбция жидкости из ткани в просвет капилляра происходит ближе к венозному отделу микроциркуляторного сегмента за счет разницы гидростатического давления на противоположных концах этого сегмента. Избыток жидкости, не выведенный на венозном конце капилляра, удаляется из ткани через сосуды лимфатической системы. Параметр гидравлической проводимости широко варьирует в различных сегментах микроциркуляторной системы разных органов и определяется структурой эндотелия и функцией снабжаемых кровью тканей [11]. Принцип Старлинга тестировался на различных моделях, главными недостатками которых было пренебрежение низкой концентрацией белка в тканях, отсутствие венозной реабсорбции и измерений лимфатического тока [2].

Обнаружение защитной функции ЭГК, нарушение которой приводит к развитию тканевого отека, позволило переосмыслить существующий принцип Старлинга. Была предложена концепция, согласно которой фильтрационные свойства капиллярной стенки определяются наличием на поверхности клеток эндотелия волокнистой пористой матрицы (ЭГК) [12, 13]. При этом локальный концентрационный градиент белка, создающий рабочее коллоидно-осмотическое (онкотическое) давление, следует применять не к общей толщине капиллярной стенки, а исключительно в отношении этой матрицы, самостоятельно регулирующей баланс между прямой и обратной фильтрацией жидкости с растворенными низкомолекулярными компонентами за счет конвекции и диффузии. Это допущение было использовано при создании математических

моделей (пространственной, а позже упрощенной одномерной) для расчета прохождения жидкости через капиллярную стенку с учетом существования ЭГК на поверхности эндотелиального слоя [14, 15]. Эксперименты для обоснования теоретического моделирования, выполненные на микрососудах брыжейки лягушки и крысы с тщательным контролем концентраций белка в тканевом пространстве и просвете сосуда методом конфокальной микроскопии, подтвердили предполагаемую роль ЭГК в сосудистой фильтрации за счет создаваемой разницы концентраций белка в областях на границах ЭГК [16, 17]. Таким образом, фильтрационные свойства капиллярных сетей в различных типах тканей могут быть сходны и зависят в первую очередь от наличия ЭГК и высокой концентрации в плазме отрицательно-заряженного альбумина, создающей требуемое для нормальной фильтрации онкотическое давление у поверхности сосудистой стенки.

Гликокаликс как сенсор и преобразователь напряжения сдвига кровотока

В силу своей локализации монослой эндотелиальных клеток сосудистой стенки испытывает на себе действие механических сил, вызываемых постоянными изменениями нестационарных параметров кровотока [18]. Помимо того, что клетки эндотелия обладают группой рецепторных систем, реагирующих на действие циркулирующих биохимических медиаторов (гормонов, хемокинов, цитокинов и нейромедиаторов), они также располагают комплексом механизмов распознавания гемодинамических воздействий и их преобразования в клеточные биохимические сигналы для регуляции сосудистого тонуса. Кровь может генерировать два типа механического воздействия на сосудистую стенку [18, 19]. Первое представляет кровяное давление, действующее перпендикулярно сосудистой стенке и оказывающее растягивающее воздействие на все ее компоненты (эндотелиальные и гладкомышечные клетки, перicytes, базальный слой и внеклеточный матрикс), а второе действует параллельно сосудистой стенке и генерирует вязкостную силу – так называемое напряжение сдвига (fluid shear stress) – на люминальной поверхности сосуда. Таким образом, тангенциальное напряжение сдвига накладывается преимущественно на монослой эндотелиальных клеток и создает в нем внутреннее напряжение, которое реализуется в виде ответных физиологических реакций, поддерживающих гомеостаз сосудистой системы. Напряжение сдвига оказывает влияние на ряд сосудистых процессов: регулирует морфологию эндотелиальных клеток, их проницаемость и продукцию вазоактивных соединений для регуляции сосудистого тонуса [18, 20]. Ответные реакции эндотелия на действие напряжения сдвига также участвуют в процессах репарации и развития сосудистых патологий, например, ангиогенеза, сосудистого ремоделирова-

ния и очагового развития атеросклероза [21-23]. Во всех указанных процессах гемодинамические факторы регулируют функции эндотелия, как при непосредственном воздействии напряжения сдвига на апикальную клеточную поверхность, так и посредством растяжения эндотелиальных клеток, что меняет локальную концентрацию биологически активных соединений у поверхности эндотелия. Исследования механизмов преобразования напряжения сдвига в ответные реакции эндотелия показали, что при воздействии этого гемодинамического параметра в эндотелиальных клетках активируются разнообразные каскады передачи сигнала через мембранные компоненты и клеточные микродомены [20]. В этом процессе могут принимать участие ионные каналы клеточной мембраны, тирозинкиназные рецепторы, белки клеточной и базальной адгезии, цитоскелет, кавеолы, G-белки и первичные реснички. ЭГК также попал в число возможных кандидатов на роль сенсора и преобразователя действия напряжения сдвига [24].

Плотный слой ЭГК на поверхности эндотелиальной клетки принимает на себя основную нагрузку при действии напряжения сдвига и полностью рассеивает его, в результате чего апикальная мембрана клетки не испытывает никакой нагрузки. Основанная нагрузка напряжения приходится на боковые цепи протеогликанов (ПГ) и их коровые белки, которые передают крутящий момент внутрь клетки [24, 25]. Нарушение структуры ЭГК при протекании патологических процессов или действии специфических протеолитических и гликолитических ферментов приводит к снижению его плотности и толщины, в результате чего основное напряжение приходится на мембрану клетки [26-28]. Эксперименты, призванные подтвердить эти предположения, были выполнены с использованием ферментов для селективного удаления компонентов ЭГК, главным образом гликозаминогликанов (ГАГ) клеточной поверхности.

Увеличение скорости кровотока приводит к быстрому расширению сосуда (вазодилатации), которое преимущественно вызывается действием вырабатываемого эндотелиальными клетками фактора релаксации сосудов – оксида азота (NO) [29, 30]. Его действие было обнаружено в культуре эндотелиальных клеток при воздействии напряжения сдвига, что реализовывалось за счет активации генерирующего NO фермента, эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), и положительной регуляции экспрессии гена этого фермента за счет увеличения внутриклеточного содержания Ca^{2+} , тетрагидробиоптерина (основного кофактора eNOS) и активации ряда протеинкиназ [31-34]. Обработка культивируемых клеток ферментом гепариназой, который расщепляет и удаляет гепаран-сульфат с ПГ клеточной поверхности, приводила к подавлению продукции NO клетками под действием напряжения сдвига [35, 36]. При этом действие гепариназы не нарушало функции NO-производящего аппарата

эндотелиальной клетки, так как механизмы синтеза вазодилататоров клеткой, индуцируемые брадикинином через B_2 -рецепторы и гистамином, повреждены не были [35]. Полученные данные четко свидетельствуют об участии содержащих гепарансульфат компонентов ЭГК в формировании клеточных ответных реакций на кровоток. Помимо гепариназы для деструкции компонентов ЭГК были использованы также следующие ферменты: гиалуронидаза, специфически расщепляющая гиалуронан; хондроитиназа, оказывающая аналогичное действие на хондроитинсульфат; и нейраминидаза, удаляющая остатки сиаловых кислот с углеводных компонентов гликопротеинов ЭГК [37-39]. В условиях *in vitro*, как в среде культивируемых эндотелиальных клеток, так и на выделенных фрагментах артерий, обработка препаратов гиалуронидазой и нейраминидазой, но не хондроитиназой, с последующим их экспонированием к действию напряжения сдвига демонстрировала подавление продукции клетками NO. Отрицательное действие хондроитиназы может объясняться незначительным содержанием хондроитинсульфата в общей структуре ЭГК, а также его возможной локализацией в глубине структуры ЭГК около клеточной мембраны [2]. Напротив, действие всех этих ферментов не оказывает никакого влияния на продукцию эндотелиальными клетками другого вазодилататора, продукта метаболизма арахидоновой кислоты простаглицина (PGI_2), что подтверждает существование множества механизмов детекции и преобразования напряжения сдвига [37, 40]. Вероятно, продукция PGI_2 может быть опосредована за счет восприимчивости к изменению динамики кровотока контактными областями базальной адгезии, сенсорные свойства которых не зависят от присутствия на апикальной поверхности клетки интактного ЭГК [20].

Полученные данные позволили сделать ряд предположений о возможном участии компонентов ЭГК в процессах улавливания и преобразования генерируемых напряжением сдвига сигналов эндотелиальными клетками. ПГ гликокаликса могут быть задействованы в децентрализованных механизмах передачи этого сигнала, когда восприятие происходит на эндотелиальной поверхности коровыми белками и ГАГ с последующей передачей сигнала внутрь клетки через трансмембранные домены сенсорных молекул, преобразованием сигнала молекулярным аппаратом клетки и запуском внутриклеточных каскадов с генерированием ответных реакций. С другой стороны, мембранные компоненты ЭГК могут участвовать в прямых централизованных механизмах передачи, когда улавливание интенсивности напряжения сдвига и преобразование его в клеточный ответ происходит только на поверхности клетки [18]. При децентрализованном механизме коровые белки ПГ передают усвоенные сигналы напряжения сдвига на кортикальный актиновый цитоскелет, который распределяет сигнал на многочисленные клеточные компоненты, такие

как клеточные органеллы, ядро, участки фокальной и базальной адгезии и межклеточные соединения [20]. Помимо ПГ в этом механизме может принимать участие гликопротеин PECAM-1 у межклеточных границ эндотелиального слоя, который связывается с цитоскелетом через катенины и участвует в активации eNOS при действии напряжения сдвига [41]. При централизованном механизме могут быть задействованы компоненты ЭГК, локализованные в кавеолах – мембранных микродоменах в виде клеточных инвагинаций, в которых наблюдается повышенное содержание сигнальных молекул (рецепторов, ионных каналов, связанной неактивной eNOS и протеинкиназ) [42]. К этим компонентам можно отнести мембранный протеогликан глипикан (содержит гепарансульфаты) и гликопротеин CD44, связывающий гиалуронан и содержащий в своей структуре остатки сиаловых кислот. Глипикан-1 способен улавливать напряжение сдвига и передавать его через кавеолу, что активирует промежуточные посредники и приводит к фосфорилированию молекулы eNOS, ее активации и высвобождению в цитоплазму [42]. Использование гепариназы ингибирует процесс фосфорилирования eNOS и ее активацию.

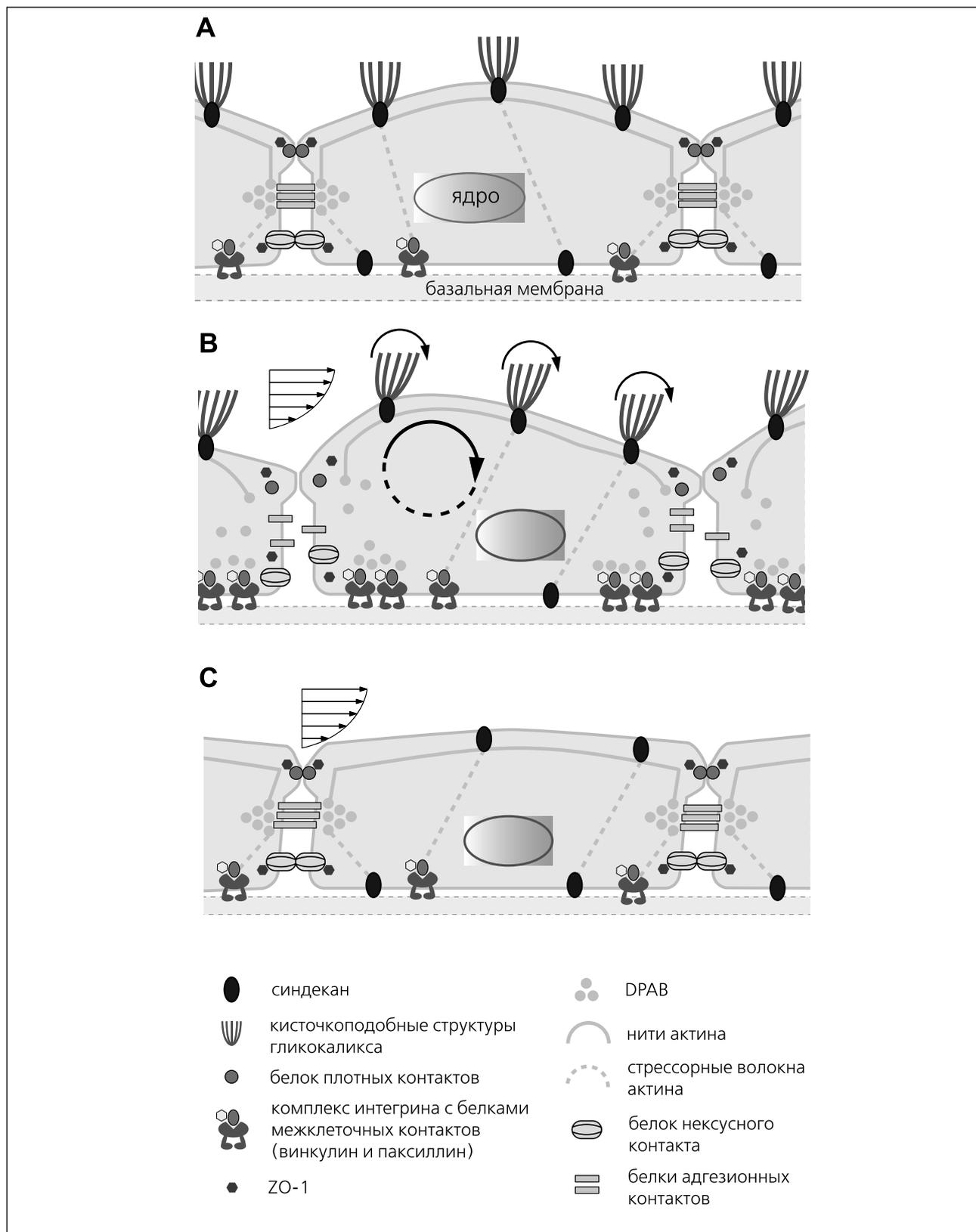
Другим аспектом реагирования эндотелиальной клетки на действие напряжения сдвига является изменение ее морфологии через ремоделирование цитоскелета и межклеточных контактов. Влияние действия напряжения сдвига было продемонстрировано на модели культивируемых эндотелиальных клеток бедренной артерии кролика, которые в течение 5 часов подвергались воздействию напряжения сдвига в 11 дин/см^2 в среде с нормальной концентрацией белков плазмы [43]. При отсутствии воздействия тока жидкости актиновые филаменты цитоскелета локализуются на границах клетки в районах межклеточных контактов, образуя плотные периферические полосы актина (DPAB, dense peripheral actin bands). Приложение нагрузки приводит к перераспределению актиновых филаментов цитоскелета с разрушением структур DPAB. Обработка клеток гепариназой не вызывает реорганизацию цитоскелета при воздействии на культуру напряжения сдвига. Подобный эффект проявляется также при культивировании эндотелиальных клеток в среде без белков плазмы, что демонстрирует зависимость свойств ЭГК от его окружения [44]. При наличии интактного ЭГК действие напряжения сдвига помимо реорганизации цитоскелета вызывает изменение межклеточных контактов через перераспределение или разрушение комплексов ряда белков этих контактов. Аналогичное действие было продемонстрировано для белка межклеточных контактов винкулина, белка щелевидных контактов (gap junction) Cx34 и белка плотных соединений (tight junction) ZO-1 [43]. Во всех случаях действие напряжения сдвига не приводило к реорганизации межклеточных соединений при обработке клеток гепариназой, т. е. при нарушении структуры ЭГК.

Полученные данные легли в основу создания модели «аттракционного электромобиля» («bumper car model»), призванной объяснить участие ЭГК в ремоделировании эндотелиальных клеток вызванных действием напряжения сдвига [43] (Рис. 1). Согласно этой модели, ЭГК передает напряжение сдвига клетке через прямой контакт с актиновым цитоскелетом и косвенные соединения (через цитоскелет) с межклеточными контактами. Выше определенных пороговых значений напряжения сдвига старые клеточные контакты могут разрушаться, что приводит к миграции и перегруппировке контактных белков для образования новых соединений, способных лучше стабилизировать эндотелиальный монослой в условиях измененного кровотока (функция адаптации). Когда целостность ЭГК нарушается, действие напряжения сдвига приходится на апикальную мембрану клетки и распространяется далее через участки межклеточных контактов, при этом реорганизации цитоскелета не происходит, а межклеточные контакты остаются неизменными.

При длительном действии напряжения сдвига на модельные системы культивируемых эндотелиальных клеток ($24-48$ часов, 15 дин/см^2) эффекты ремоделирования в присутствии интактного ЭГК проявляются в виде изменения формы клеток, их выравнивая в направлении воздействия тока жидкости и значительного подавления пролиферации [45]. В условиях отсутствия кровотока эндотелиальные клетки имеют многогранную форму, тогда как напряжение сдвига заставляет их вытягиваться и ориентироваться в направлении действия нагрузки. Обработка клеток гепариназой III не вызывала подобных изменений в условиях экспериментального кровотока. Гепариназа оказывает действие и на клеточную пролиферацию: нарушение структуры ЭГК приводит к устранению ингибирующего эффекта напряжения сдвига на способность эндотелиальных клеток к делению [45]. В условиях отсутствия кровотока у клеток эндотелия скорость пролиферации и подвижность достаточно высокие, тогда как воздействие физиологического уровня напряжения сдвига значительно подавляют пролиферацию и подвижность. Считается, что удаление ЭГК устраняет ингибирующее эти процессы действие гемодинамических сил в результате реорганизации межклеточных контактов, что приводит к существенному изменению морфологии и поведения клеток в монослое эндотелия сосудистой стенки.

Кроме того, напряжение сдвига может в определенной степени регулировать состав и толщину ЭГК. Было показано, что его воздействие в два раза увеличивает содержание гиалуронана в ЭГК культивируемых эндотелиальных клеток вены пуповины человека [46]. Другое исследование показало, что в областях ламинарного тока сонной артерии мыши толщина ЭГК ($399 \pm 174 \text{ нм}$) значительно превышала толщину в синусной области бифуркации потока с деформированным профилем

Рисунок 1. Структурная организация компонентов эндотелиальных клеток при действии напряжения сдвига кровотока.



А. Воздействие напряжения сдвига кровотока на клетки отсутствует. Белки межклеточных контактов соседних клеток взаимодействуют друг с другом, организуя клеточный слой эндотелия.

Б. На клетки действует напряжение сдвига. Кисточкоподобные структуры ЭГК под действием локального крутящего момента деформируются и передают суммирующий крутящий момент на кортикальный актиновый скелет клетки, в результате чего происходит реорганизация формы клетки и межклеточных контактов для формирования клеточного ответа на действие напряжения сдвига определенной силы.

С. На клетки действует напряжение сдвига при удалении ЭГК с клеточной поверхности. Межклеточные контакты остаются неизменными, а изменение формы клеток происходит за счет локализованных у базальной мембраны интегринов и стрессорных актиновых волокон.

(73 ± 36 нм) [27]. Тем не менее, в этой же синусной области на участках с ламинарным профилем течения крови толщина ЭГК незначительно отличалась от толщины линейных участков (308 ± 185 нм).

Все эти данные подчеркивают значимость интактного ЭГК как одного из активных участников процесса механотрансдукции напряжения сдвига кровотока и ремоделирования эндотелия при поддержании сосудистого гомеостаза в меняющихся условиях циркуляции.

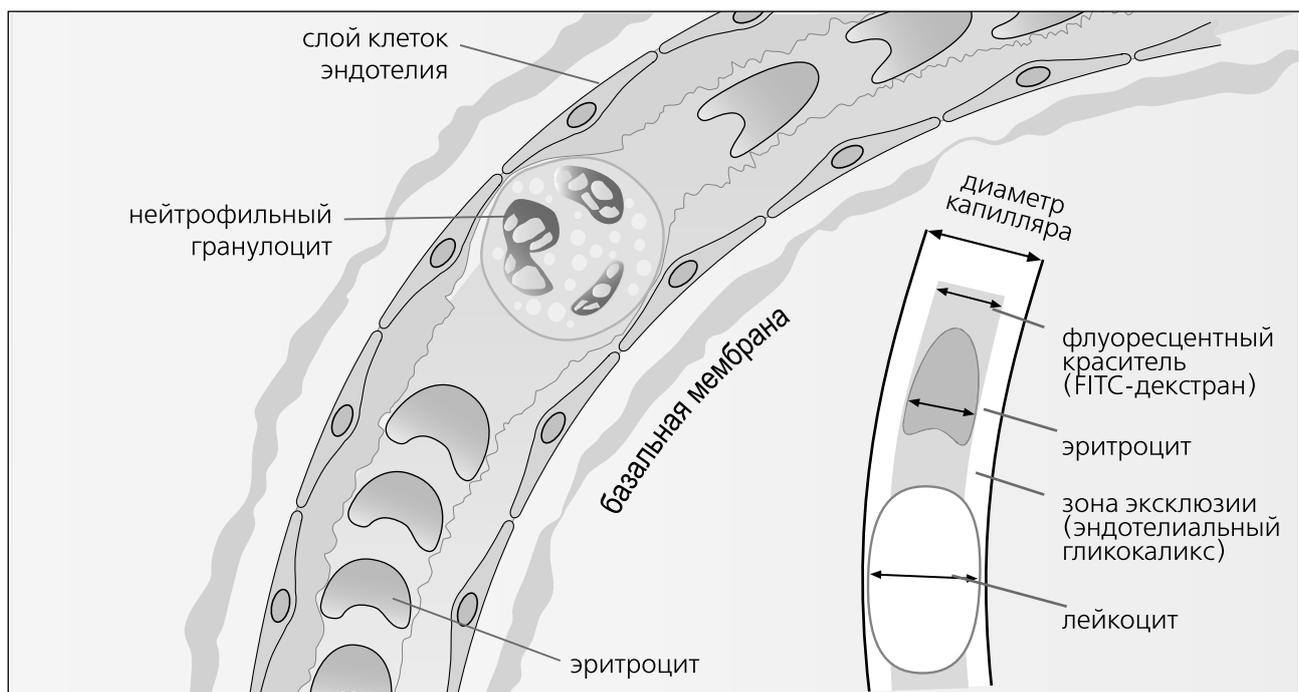
Гликокаликс как регулятор взаимодействий эндотелия и клеток крови

Экранируя люминальную поверхность сосудистой стенки, ЭГК может регулировать взаимодействия клеток эндотелия с циркулирующими клетками крови. В отношении эритроцитов он выполняет функцию «смазочного материала», способствующего продвижению этих клеток по сосудистому руслу, в особенности в капиллярах системы микроциркуляции [47]. Само по себе присутствие ЭГК *in vivo* в этих сегментах является основным параметром, регулирующим локальную вязкость крови и гематокрит капилляров, и значительно увеличивает капиллярное сопротивление для циркулирующих компонентов [48, 49]. Увеличение микрососудистого сопротивления в областях с повышенной скоростью кровотока (>1000 мкм/с) может вызывать деформацию формы эритроцита и создавать зону исключения циркулирующих клеток у поверхности сосудистой стенки, заполняемую расширяющимся ЭГК, что выглядит так, будто ЭГК отталкивает эритроциты от поверхности стенки [47, 50] (Рис. 2).

Этот эффект устраняется при обработке участка сосуда направленным действием ультрафиолетового излучения, вызывающим разрушение структуры ЭГК [47]. На участках микроциркуляции с пульсирующим кровотоком, где скорость крови не превышает 100-200 мкм/с и периодически падает до «нуля» (в капиллярах скелетных мышц), эритроциты изменяют свою форму, расширяясь и заполняя собой все люминальное пространство сосуда [51]. Проходя по капилляру и максимально сжимая ЭГК, они генерируют за собой подъемную силу, достаточную для быстрого восстановления эластичной структуры ЭГК до своего исходного размера [47, 52]. Вполне вероятно, что при тесном контакте ЭГК может взаимодействовать с рецепторами клеточной поверхности эритроцита для организации межклеточного обмена. Так, методом электронной микроскопии на границах эндотелиальной клетки и эритроцита в момент их контакта были обнаружены структуры в виде щетинок, образующие каналы между плазмолеммами клеток, которые обеспечивали межклеточный перенос ионов [53]. Кроме того, внеклеточное окружение самого эритроцита [54, 55] и ЭГК сосудистой стенки [56-58] создают диффузионный барьер, способный значительно снижать скорость связывания продуцируемого эндотелием NO локализованным в эритроцитах гемоглобином.

В условиях нормы сосудистый эндотелий не взаимодействует с тромбоцитами, адгезии которых препятствует целостность и антитромботические свойства сосудистой стенки [59]. Активация эндотелиальных клеток при гипертензии, сахарном диабете и в процессе ишемия-реперфузия

Рисунок 1. Разные типы нестабильных атеросклеротических бляшек [19].



приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и изменению поверхностной структуры монослоя с экспонированием на нем молекул адгезии (P- и E-селектины, ICAM-1, VCAM-1), инициирующих адгезию и роллинг циркулирующих тромбоцитов и лейкоцитов [59-62]. Подобные изменения представляет собой один из важнейших факторов развития атеросклеротического поражения. Процесс адгезии тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке является достаточно подробно изученным, в отличие от процессов роллинга и адгезии тромбоцитов к интактному активированному эндотелию, установленному *in vivo*, в том числе и при высоких значениях напряжения сдвига [63, 64]. Механизмы подобного поведения тромбоцитов схожи с взаимодействием и роллингом активированных лейкоцитов на активированном эндотелии, хотя последний этап подобного взаимодействия (трансмиграция тромбоцитов через неповрежденную сосудистую стенку в ткань) не происходит. Первичная адгезия тромбоцитов к эндотелиальным клеткам приводит к накоплению активированных тромбоцитов и образованию агрегатов на поверхности сосудистой стенки, что создает базу для последующего рекрутинга лейкоцитов [65]. Вероятно, что ЭГК может принимать участие в инициации процесса первичной адгезии тромбоцитов к сосудистой стенке. В нескольких работах было показано, что нарушение целостности ЭГК действием нейраминидазы [66] или окисленных ЛНП [67] приводило к адгезии на эндотелии тромбоцитов.

Адгезия лейкоцитов на эндотелии также требует активации последнего и экспонировании на его поверхности молекул адгезии. Процесс присоединения рекрутированных лейкоцитов к эндотелию с последующим роллингом вдоль поверхности сосудистой стенки и экстравазацией (диапедезисом) в ткани является начальным этапом реализации механизмов системы врожденного иммунитета для борьбы с инфекционными стимулами и репарации поврежденных тканей. При этом избыточное накопление лейкоцитов в местах поражения может провоцировать развитие ряда патологий, таких как васкулит, аутоиммунные заболевания, менингит, атеросклероз и поражение тканей в процессе ишемии/реперфузии [68]. Роль ЭГК в иницировании лейкоцитарной адгезии выглядит двоякой. С одной стороны, молекулы клеточной адгезии входят в состав ЭГК и присутствуют в нем на постоянной основе (конstitutивные E-селектин, ICAM-2 и PECAM-1) или при активации эндотелия. С другой стороны, интактный ЭГК снижает адгезию лейкоцитов, экранируя своими поверхностными компонентами молекулы адгезии (Рис. 2) [69]. В ряде экспериментов по исследованию степени участия ЭГК в адгезии лейкоцитов к эндотелию было показано, что как прямое действие удаляющей из ЭГК гепарансульфаты гепариназы, так и опосредованное действие проатерогенных и воспалительных стимулов (окисленных ЛНП, TNF- α), снижающих синтез ПГ и уре-

жающих сеть ЭГК, активизирует роллинг и усиливает адгезию иммунных клеток к сосудистой стенке [70, 71]. Следует учитывать, что процесс миграции лейкоцитов состоит из нескольких этапов, включающих в себя первичное связывание и обратимый роллинг, остановку лейкоцита с прочным связыванием и трансмиграцию в субэндотелиальную область [59]. Каждый этап вызывает изменение морфологии и биохимии взаимодействующих клеток, и разнообразные компоненты ЭГК принимают самое активное участие в этих процессах.

Известно, что толщина ЭГК значительно превышает высоту внеклеточной части адгезионных молекул, что должно препятствовать первоначальной адгезии циркулирующих иммунных клеток. Так, высота внеклеточного домена P-селектина (одной из молекул, инициирующих адгезию лейкоцитов к эндотелию) не превышает 38 нм, что в 8 раз меньше толщины ЭГК в капилляре [72, 73]. Полученные методом генетической инженерии эндотелиальные клетки с более короткими молекулами P-селектина демонстрируют снижение адгезии нейтрофилов к эндотелиальному монослою. Клетки с дефектным гликозилированием и, как следствие, недостаточной толщиной ЭГК обладают повышенной степенью адгезии иммунных клеток [74]. Прижизненная микроскопия обычно фиксирует иницирование слабой адгезии и обратимого роллинга лейкоцитов на выходе из капилляров, где проходящий лейкоцит заполняет весь просвет микрососуда и максимально сжимает ЭГК, в посткапиллярных венах [75] (Рис. 2). В этой области контакт лейкоцита с клетками эндотелия может быть вызван как связыванием рецептора лейкоцитов CD44 с гиалуронатом поверхности эндотелия, так и благодаря прониканию специфических микроворсинок лейкоцита вглубь ЭГК с временным и непрочным контактом расположенных на них рецепторов с контрагентами эндотелия [76-78]. Примечательно, что длина этих микроворсинок примерно соотносится с толщиной ЭГК в микроциркуляторном сегменте ($0,3 \div 0,7$ мкм длина микроворсинки против $0,2 \div 0,5$ мкм толщины ЭГК), а микроскопия *in vitro* демонстрирует роллинг лейкоцита как процесс, при котором клетка перемещается в подвешенном состоянии на расстояние примерно 500 нм от поверхности эндотелия [79, 80]. На активированном эндотелии первичные временные контакты опосредуются связыванием: 1) P- и E-селектинов эндотелия с рецептором PSGL-1 лейкоцита; 2) интегринов лейкоцита (в частности, $\alpha 4\beta 1$) с молекулой VCAM-1 эндотелия и 3) фракталином эндотелия и его рецептором CX3CR1 на лейкоците [59]. Образующиеся контакты вызывают реорганизацию цитоскелета клеток, активацию сигнальных каскадов и изменение транскрипционного профиля эндотелия, а также активацию лейкоцитарных интегринов, которую вызывают продуцируемые активированным эндотелием хемокины. Для их презентации эндотелий увеличивает экспрессию гепарансульфата на своей поверх-

ности, увеличивая толщину сокращенного ранее ЭГК [81]. Дополнительная стимуляция лейкоцитов приводит к образованию прочных связей между $\beta 2$ и $\alpha 4\beta 1$ интегринами лейкоцита и молекулами эндотелия VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 и остановке лейкоцита. Наконец, в последующей трансмиграции лейкоцитов через эндотелиальный монослой, как напрямую через эндотелиальную клетку, так и при реорганизации межклеточных контактов соседних клеток, тоже принимают участие входящие в состав ЭГК молекулы (PECAM-1, ICAM-1 и VCAM-1). Таким образом, ЭГК вносит значительный вклад в регуляцию адгезивных свойств сосудистой стенки, которые значительно возрастают после повреждения структуры ЭГК в результате действия воспалительных и проатерогенных стимулов с последующей активацией эндотелия. Возможным средством противодействия роллингу и адгезии лейкоцитов в этих условиях может быть подход, направленный на достижение восстановления ЭГК путем инфузии его компонентов, например, гепарансульфата [70]. Следует отметить, что роллинг и адгезия лейкоцитов постоянно наблюдаются в венах кожи при отсутствии воспаления в условиях нормы, и природа этих локальных взаимодействий остается до сих пор не определенной [82].

Гликокаликс как регулятор микроокружения клеток эндотелия

Благодаря своей ячеистой периодической структуре, преимущественно зависящей от ПГ и их боковых цепей ГАГ, ЭГК создает на поверхности эндотелия гетерогенную структуру, которая может аккумулировать внутри себя разнообразные соединения, функциональность которых зависит от взаимодействия с ЭГК. Локализованные в ЭГК соединения могут быть как производными эндотелиальных клеток и клеток субэндотелиального пространства, так и сорбироваться на ЭГК из кровотока. Взаимодействие циркулирующих компонентов плазмы с локализованными в ЭГК активными соединениями может протекать по нескольким механизмам.

Во-первых, ЭГК локализует процесс связывания рецептора со своим лигандом, создавая необходимую концентрацию взаимодействующих соединений и предоставляя возможность осуществления специфической сигнальной или ферментативной модификации. Так, структуры внеклеточных ПГ гепарансульфата регулируют образование активного комплекса FGF со своим рецептором, регулирующего пролиферацию клеток эндотелия и процесс ангиогенеза [83, 84]. Аналогичным образом протеогликаны ЭГК могут регулировать взаимодействие выполняющих транспорт холестерина и триглицеридов ЛНП с липопротеинлипазой, тем самым участвуя в метаболизме липидов [85].

Во-вторых, связывание биомолекул крови с ЭГК может приводить к созданию концентрационного

градиента, необходимого для изменения транскрипционного профиля клетки в процессах ее созревания и дифференцировки. Примером подобного взаимодействия может быть локализация факторов роста, в частности TGF β 1/2 (трансформирующие факторы роста) и VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), регулирующих разнообразные процессы клеточной сигнализации, включая дифференцировку гладкомышечных клеток, тонус и реактивность сосудов [86, 87]. На модели острого легочного поражения у мышей, индуцированного интратрахеальным введением липополисахарида (LPS), было отмечено разрушение эндотелиального клеточного барьера из-за увеличения экспрессии гиалуронан-связывающего белка-2 (HABP-2) [88]. Его действие развивалось через активацию PAR-1 и PAR-3 (активируемых протезами рецепторов 1 и 3) с последующим включением малой гуанозинтрифосфатазы (RhoA) и серин/треонин киназы (ROCK). Гиалуронан-связывающий белок-2 предстает новым регулятором сосудистой целостности [88].

Наконец, ЭГК может содержать группу ферментов, их активаторов и ингибиторов, которые дополнительно придают структуре ЭГК специфические защитные функции. Так, ЭГК содержит целую группу соединений, обладающих антикоагулянтными свойствами, к которым относятся антитромбин III, тромбомодулин, эндотелиальный рецептор протеина C, кофактор II гепарина и белковый ингибитор тканевого фактора TFPI [89]. Эти соединения поддерживают в условиях физиологической нормы тромборезистентность сосудов, сохраняя кровоток при незначительных повреждениях сосудистой стенки, тогда как ее серьезные повреждения приводят к контакту богатой тканевым фактором субэндотелиальной зоны с кровью и запускают каскады свертываемости [90, 91]. Антитромбин III представляет собой сильный ингибитор прокоагулянтных ферментов, таких как тромбин и факторы свертывания (XIIa, XIa, Xa и IXa) [92]. Его активность усиливает связывание со специфическими участками гепарансульфата протеогликанов ЭГК [93]. Тромбомодулин является синтезируемым эндотелием гликопротеином, который содержит цепи хондроитинсульфата (опосредующие его включение в структуру ЭГК) и играет роль рецептора тромбина [94]. Связывая последний, тромбомодулин ингибирует превращение фибриногена в фибрин, способствует активности антитромбина III и активирует антикоагулянтный протеин C. Активированный протеин C приобретает протеазные свойства и совместно с протеином S (в качестве кофактора) ингибирует образование тромбина путем разрушения факторов свертывания крови Va и VIIIa и стимулирует фибринолиз [95]. Другим ингибитором тромбина является кофактор II гепарина, который образует с фактором свертывания II стабильный комплекс, при этом взаимодействие значительно ускоряется в присутствии дерматансульфата ЭГК [96, 97]. TFPI также является ингибитором факто-

ров свертываемости крови VIIa и Xa. В сосудистой стенке он присутствует в связанном с гепарансульфатами и гликопротеинами виде, при этом клиренс комплекса TFPI и связанного фактора осуществляется за счет ГАГ-компонентов ПГ [98, 99]. Приводящие к активации или дисфункции нативного эндотелия процессы вызывают снижение экспрессии его клетками антикоагулянтных факторов и нарушают гемостатический баланс. Кроме того, специфическое разрушение ЭГК (индуцируемое окисленными ЛНП) напрямую вызывает тромбообразование и адгезию тромбоцитов в интервале 10 минут [100]. Помимо этого, ЭГК может аккумулировать активирующие эндотелий и лейкоциты агонисты (цитокины и хемокины), которые повышают адгезию циркулирующих клеток к эндотелию (при нарушении структуры ЭГК) и нарушают в нем синтез компонентов ЭГК (например, ПГ гепаран-сульфата и гиалуронана) [71, 101-103].

К защитной функции ЭГК может относиться его способность подавлять продукцию и накопление активных форм кислорода (АФК) благодаря аккумуляции антиоксидантов, в первую очередь внеклеточной супероксиддисмутазы (ec-SOD), преобразующей цитотоксический супероксид радикал в перекись водорода [104-106]. Этот фермент обладает как высокой степенью сродства к гепарансульфатам ЭГК, обусловленной наличием специфического, положительно заряженного домена связывания гепариноподобных структур, так и высоким профилем экспрессии (70% общего содержания ферментов СОД в тканях сосуда) [107]. Помимо апикальной поверхности ec-SOD локализуется и в субэндотелиальном матриксе. Основная протекторная функция этого фермента заключается в поддержании паракринной функции эндотелиального NO в отношении гладкомышечных клеток сосудов, которая может подавляться путем конвертации NO супероксид анионом в высокоактивный окислитель пероксинитрит-анион (ONOO⁻), активный участник оксидативного стресса [108]. Благодаря своей функции, ec-SOD может участвовать в таких общих процессах, как регуляция кровяного давления и поддержании сосудистой функции.

Развитие тканевого отека и набухания клеток эндотелия, оксидативного стресса и локального воспаления сосудистой ткани, активации и рекрутинга лейкоцитов в посткапиллярных венулах, опосредованное вышеописанными механизмами при разрушении ЭГК, обнаруживаются в микроциркуляторной сети при поражениях, вызываемых процессами тотальной и частичной ишемии с последующей реперфузией [109-112]. Экспериментально было показано, что кишечная ишемия/реперфузия значительно снижает размер ЭГК в венулах брыжейки крысы, вероятно, в результате удаления ГАГ с поверхности эндотелия [113]. Подобное воздействие может быть смягчено подавлением активности локализованной с гепарансульфатами ЭГК ксантин-оксидоредуктазы, генерирующей АФК,

а также располагающейся в гликокаликсе ec-SOD, напротив, подавляющей генерирование АФК [114, 115], что говорит о значительном вкладе оксидативного стресса в развитие ишемии/реперфузии. С другой стороны, введение эндогенных гиалуронана и пертуссин-токсина, ингибирующих индуцируемое G-белком удаление ГАГ-цепей ЭГК, снижает тяжесть поражения [113]. Клинически, удаление ЭГК при ишемии/реперфузии было показано по увеличению содержания синдекана-1 и гепарансульфата в плазме пациентов с периоперационной ишемией [116].

Участие ЭГК в развитии патологических процессов

Благодаря широкому набору присущих ЭГК функций, эта пограничная структура выступает в качестве важного регулятора сосудистого гомеостаза. Ее повреждение при воздействии разнообразных патологических стимулов приводит к нарушению функций ЭГК, что вносит вклад в ряд сосудистых патологий, основными из которых являются сахарный диабет, ИБС, воспалительные процессы сосудистой системы, а также гиперхолестеринемия и атеросклероз.

Сахарный диабет и сопутствующая им гипергликемия является широко распространенным заболеванием, приводящим к тяжелым поражениям сердечно-сосудистой системы как на уровне макро- и микроциркуляции [117]. Было показано, что острая гипергликемия вызывает значительное разрушение структуры ЭГК и увеличение сосудистой проницаемости в пораженных участках [118, 119]. Одним из возможных механизмов поражения ЭГК, вероятно, предстает отрицательная регуляция экспрессии ПГ гепарансульфата, воздействие гликирующих агентов непосредственно на белки ЭГК и недостаточный отклик эндотелиального монослоя на действие напряжения сдвига [120]. Другим возможным фактором повреждения может выступать продукция АФК и увеличение активности ферментов, разрушающих ЭГК [118, 119]. Установлено, что системный объем ЭГК у пациентов с сахарным диабетом I типа был в половину ниже, чем этот же показатель у здоровых добровольцев, тогда как наличие микроальбуминурии у этих больных еще больше снижало системный объем ЭГК [119]. У пациентов с сахарным диабетом при сокращенном объеме ЭГК в крови также увеличивается содержание циркулирующих гиалуронана и гиалуронидазы. Активация разлагающих ЭГК ферментов, воспалительных и коагулянтных каскадов может вызывать системное повреждение ЭГК, увеличивать проницаемость сосудистой стенки к альбумину (микроальбуминурия) и ЛНП и приводить к развитию ассоциированных с диабетом сердечнососудистых заболеваний.

Другим патологическим механизмом удаления ЭГК с поверхности сосудистой стенки является ги-



перхолестеринемия и развивающийся вследствие этого атеросклероз [121]. Хотя точные механизмы участия ЭГК в развитии атеросклероза при гиперхолестеринемии пока не установлены, накопилось значительное количество данных о том, что ЭГК может регулировать возможность образования атеросклеротических бляшек [122]. В модельных экспериментах острая гиперхолестеринемия, индуцируемая введением в кровоток значительных доз окисленных ЛНП, вызывала разрушение ЭГК в микроциркуляторной сети крематерной мышцы хомяка и последующую адгезию тромбоцитов [100]. Введение ес-SOD и каталазы в этом эксперименте подавляло разложение ЭГК, что демонстрировало вовлечение генерируемых АФК в развивающийся патологический процесс. Было показано, что диета с высоким содержанием холестерина снижает толщину ЭГК и увеличивает размер новообразованных комплексов «интима-медиа» на участках атерогенного риска в синусе сонной артерии мыши с нокаутированным геном аполипопротеина E [27, 123]. Этот эксперимент подтверждают клинические данные, демонстрирующие, что повышенное содержание холестерина ЛНП у пациентов с семейной гиперхолестеринемией коррелирует со снижением системного объема ЭГК, тогда как направленная на снижение холестерина терапия приводит к частичному восстановлению этой характеристики [124]. Возможно, интактный ЭГК предотвращает миграцию липопротеинов в субэндотелиальное пространство, хотя в захвате этих соединений может принимать участие широко распространенный в ЭГК синдекан [125]. С другой стороны, может происходить активация разлагающих ЭГК ферментов, что было моделировано постоянными инфузиями гиалуронидазы мышам с нокаутированным геном аполипопротеина E [126]. Это вызывало разрушение ЭГК, развитие микроальбуминурии и нестабильного фенотипа атеросклеротической бляшки.

Определенный вклад в развитие атеросклероза и повреждений, связанных с процессом ишемия/реперфузия, может вносить сосудистое воспаление с привлечением в очаг поражения иммунных клеток, участвующих как в начальных этапах формирования атеросклеротической бляшки, так и в финальном этапе ее дестабилизации и разрушения [127, 128]. Экспериментально было показано, что воздействие воспалительных агентов, таких как TNF- α и эндотоксин, приводит к разрушению структуры ЭГК микроциркуляторного русла и дальнейшему развитию тканевого отека с повреждением сосудистой стенки и тромбозом [129, 130]. Эндогенное воздействие обладающего антикоагулянтными свойствами активированного протеина C устраняет влияние эндотоксина на ЭГК. Кроме того, в исследованиях участия эндотелия в адгезии лимфоцитов была продемонстрирована способность последнего вовлекать ПГ гепаран-сульфата в захват и презентацию воспалительных цитокинов [131]. Устранение из ЭГК гиалуронана и сиаловых кислот

может усиливать эти свойства [132, 133]. Помимо этого цитокины могут активировать локализованные в ЭГК или секретируемые эндотелием протеазы и гликозидазы, что особенно значимо для локального разрушения ЭГК в микроциркуляторном русле, где обычно инициируется первичных захват активированных лейкоцитов [26, 127].

Терапевтические вмешательства, направленные на сохранение или восстановление ЭГК, могут предоставить эффективный инструмент для регуляции воспалительных процессов. Так, пациенты с хроническими воспалительными процессами (ревматоидный артрит или системная красная волчанка) демонстрируют предрасположенность к развитию атерогенных поражений, тогда как адекватная терапия провоспалительной активности снижает развивающуюся дисфункцию сосудов [134, 135]. Контролируемое развитие воспалительного процесса у человека, индуцированное эндотоксином, приводит к частичной деградации ЭГК, снижению его толщины, повышению содержания гиалуронана в плазме и миграции лейкоцитов в очаг поражения [136]. Введение растворимого рецептора TNF- α (препарат etanercept) в вышеописанной модели устраняло все перечисленные воспалительные эффекты, демонстрируя защитное действие ЭГК против развития последствий воспалительных реакций.

Заключение

Эндотелиальный гликокаликс способен принимать участие в ряде патологических процессов сердечнососудистой системы и в норме выполняет функцию протекторного барьера и регулятора сосудистого гомеостаза, тогда как при активации эндотелия и нарушении его поверхностной структуры эта функция теряется. Основываясь на этом заключении, гликокаликс может быть использован в дальнейшем для более подробного исследования механизмов развития патологических состояний, а также в качестве терапевтической мишени и возможного маркера развития сердечнососудистых заболеваний.

Гранты

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

Список литературы

1. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004; 93(1): 105-113.
2. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9: 121-167.
3. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(1): H285-H289.
4. Firth JA. Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. *J Anat* 2002; 200(6): 541-548.
5. van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(6): H2848-H2856.
6. Renkin EM. Multiple pathways of capillary permeability. *Circ Res* 1977; 41(6): 735-743.
7. 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.
8. van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA. Charge modification of the endothelial surface layer modulates the permeability barrier of isolated rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(6): H2503-H2507.
9. Dvorak HF. Vascular permeability to plasma, plasma proteins, and cells: an update. *Curr Opin Hematol* 2010; 17(3): 225-29.
10. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* 1896; 19(4): 312-326.
11. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100(2): 158-173.
12. Weinbaum S. 1997 Whitaker Distinguished Lecture: Models to solve mysteries in biomechanics at the cellular level; a new view of fiber matrix layers. *Ann Biomed Eng* 1998; 26(4): 627-643.
13. Michel CC. Starling: the formulation of his hypothesis of microvascular fluid exchange and its significance after 100 years. *Exp Physiol* 1997; 82(1): 1-30.
14. Hu X, Weinbaum S. A new view of Starling's hypothesis at the microstructural level. *Microvasc Res* 1999; 58(3): 281-304.
15. Zhang X, Adamson RH, Curry FR, Weinbaum S. A 1-D model to explore the effects of tissue loading and tissue concentration gradients in the revised Starling principle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(6): H2950-H2964.
16. Hu X, Adamson RH, Liu B. et al. Starling forces that oppose filtration after tissue oncotic pressure is increased. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(4): H1724-H1736.
17. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X. et al. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol* 2004; 557(Pt 3): 889-907.
18. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75(3): 519-560.
19. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(3): H1209-H1224.
20. Мелькумянц АМ, Балашов СА. Механочувствительность артериального эндотелия. - Тверь: Издательство "Триада". 2005; 208 с.: 41-58; 70-74.
21. Jones EA, le Noble F, Eichmann A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 388-395.
22. Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 1980; 239(1): H14-H21.
23. Caro CG. Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(2): 158-161.
24. Weinbaum S, Zhang X, Han Y. et al. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(13): 7988-7995.
25. Secomb TW, Hsu R, Pries AR. Effect of the endothelial surface layer on transmission of fluid shear stress to endothelial cells. *Biorheology* 2001; 38(2-3): 143-150.
26. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(5): H1672-H1680.
27. van den Berg BM, Spaan JA, Rolf TM, Vink H. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(2): H915-H920.
28. Zuurbier CJ, Demirci C, Koeman A. et al. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells. *J Appl Physiol* 2005; 99(4): 1471-1476.
29. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250(6 Pt 2): H1145-H1149.
30. Michel T. NO way to relax: the complexities of coupling nitric oxide synthase pathways in the heart. *Circulation* 2010; 121(4): 484-486.
31. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(3): C499-C508.
32. Corson MA, James NL, Latta SE. et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984-991.
33. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res* 1998; 82(6): 686-695.
34. Widder JD, Chen W, Li L, Dikalov S. et al. Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis by shear stress. *Circ Res* 2007; 101(8): 830-838.
35. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K. et al. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 2003; 93(10): e136-e142.



36. Chappell D., Jacob M., Rehm M. et al. Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem* 2008; 389(1): 79-82.
37. Pabakis M.Y., Kosky J.R., Dull R.O., Tarbell J.M. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(1): 228-233.
38. Hecker M., Mülsch A., Bassenge E., Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *Am J Physiol* 1993; 265(3 Pt 2): H828-H833.
39. Mochizuki S., Vink H., Hiramatsu O. et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(2): H722-H726.
40. Frangos J.A., Eskin S.G., McIntire L.V., Ives C.L. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 1985; 227(4693): 1477-1479.
41. Osawa M., Masuda M., Kusano K., Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol* 2002; 158(4): 773-785.
42. 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.
43. Thi M.M., Tarbell J.M., Weinbaum S., Spray D.C. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16483-16488.
44. Adamson R.H., Clough G. Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels. *J Physiol* 1992; 445: 473-486.
45. Yao Y., Rabodzey A., Dewey C.F. Jr. Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(2): H1023-H1030.
46. Gouverneur M., Spaan J.A., Pannekoek H. et al. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(1): H458-H462.
47. Secomb T.W., Hsu R., Pries A.R. 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(2): H629-H636.
48. Lipowsky H.H. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation* 2005; 12(1): 5-15.
49. Pries A.R., Secomb T.W. Rheology of the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003; 29(3-4): 143-148.
50. Secomb T.W., Skalak R., Oozkaya N., Gross J.F. Flow of axisymmetric red blood cells in narrow capillaries. *J Fluid Mech* 1986; 163: 405-423.
51. Vink H., Duling B.R. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996; 79(3): 581-589.
52. Feng J., Weinbaum S. Lubrication theory in highly compressible porous media: the mechanics of skiing, from red cells to humans. *J Fluid Mech* 2000; 422: 281-317.
53. Шахламов В.А. Капилляры / под общ. ред. Савельева С.В. - М.: ВЕДИ. 2007; 288 с.: 30-31.
54. Coin J.T., Olson J.S. The rate of oxygen uptake by human red blood cells. *J Biol Chem* 1979; 254(4): 1178-1190.
55. Liu X., Müller M.J., Joshi M.S. et al. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(30): 18709-18713.
56. Butler A.R., Megson I.L., Wright P.G. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in vasculature. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425(1): 168-176.
57. Liao J.C., Hein T.W., Vaughn M.W. et al. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(15): 8757-8761.
58. Vaughn M.W., Kuo L., Kiao J.C. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt 2): H1705-H1714.
59. Wagner D.D., Frenette P.S. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008; 111(11): 5271-5281.
60. Levi M., van der Poll T., Buller H.R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004; 109: 2698-2704.
61. Hadi H.A., Suwaidi J.A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(6): 853-876.
62. Sakao S., Tatsumi K., Voelkel N.F. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respir Res* 2009; 10: 95-104.
63. Kottke-Marchant K. Importance of platelets and platelet response in acute coronary syndromes. *Cleve Clin J Med* 2009; 76 Suppl 1: S2-S7.
64. Frenette P.S., Johnson R.C., Hynes R.O., Wagner D.D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(16): 7450-7454.
65. May A.E., Seizer P., Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(3): S5-S10.
66. Pries A.R., 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.
67. Vink H., Constantinescu A.A., Spaan J.A.E. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer. Implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; 101: 1500-1502.
68. Zarbock A., Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* 2008; 172(1): 1-7.
69. Nieuwdorp M., Meuwese M.C., Vink H. et al. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16(5): 507-511.
70. Constantinescu A.A., Vink H., Spaan J.A. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(9): 1541-1547.

71. Henry C.B., Duling B.R. TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(6): H2815-H2823.
72. van den Berg B.M., Vink H., Spaan J.A. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* 2003; 92(6): 592-594.
73. Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346(6283): 425-434.
74. Patel K.D., Nollert M.U., McEver R.P. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J Cell Biol* 1995; 131(6 Pt 2): 1893-1902.
75. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 1996; 32(4): 733-742.
76. Butler L.M., Rainger G.E., Nash G.B. A role for the endothelial glycosaminoglycan hyaluronan in neutrophil recruitment by endothelial cells cultured for prolonged periods. *Exp Cell Res* 2009; 315(19): 3433-3441.
77. Zhao Y., Chien S., Weinbaum S. Dynamic contact forces on leukocyte microvilli and their penetration of the endothelial glycocalyx. *Biophys J* 2001; 80(3): 1124-1140.
78. Bruehl R.E., Springer T.A., Bainton D.F. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1996; 44(8): 835-844.
79. Tissot O., Pierres A., Foa C. et al. Motion of cells sedimenting on a solid surface in a laminar shear flow. *Biophys J* 1992; 61(1): 204-215.
80. Tempelman L.A., Hammer D.A. Receptor-mediated binding of IgE-sensitized rat basophilic leukemia cells to antigen-coated substrates under hydrodynamic flow. *Biophys J* 1994; 66(4): 1231-1243.
81. Middleton J., Patterson A.M., Gardner L. et al. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002; 100(12): 3853-3860.
82. Janssen G.H., Tangelder G.J., Oude Egbrink M.G., Reneman R.S. Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals. *Am J Physiol* 1994; 267(3 Pt 2): H1199-H1204.
83. Allen B.L., Filla M.S., Rapraeger A.C. Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. *J Cell Biol* 2001; 155(5): 845-858.
84. Harmer N.J. Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signalling. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 3): 442-445.
85. Wilsie L.C., Orlando R.A. The low density lipoprotein receptor-related protein complexes with cell surface heparan sulfate proteoglycans to regulate proteoglycan-mediated lipoprotein catabolism. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15758-15764.
86. López-Casillasü, Wrana J.L., Massagué J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993; 73(7): 1435-1444.
87. Robinson C.J., Stringer S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 5): 853-865.
88. Mambetsariyev N., Mirzapoziazova T., Mambetsariyev B. et al. Hyaluronic acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(3): 483-490.
89. Egbrink M.G., Van Gestel M.A., Broeders M.A. et al. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation* 2005; 12(3): 287-300.
90. Tanaka K.A., Key N.S., Levy J.H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009; 108(5): 1433-1446.
91. Levi M., van der Poll T., Büller H.R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004; 109(22): 2698-2704.
92. Quinsey N.S., Greedy A.L., Bottomley S.P. et al. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(3): 386-389.
93. Nader H.B., Pinhal M.A., Bai E.C. et al. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(6): 699-709.
94. Di Cera E. Thrombin. *Mol Aspects Med* 2008; 29(4): 203-254.
95. Esmon C.T. The protein C pathway. *Chest* 2003; 124(3 Suppl): 26S-32S.
96. Parker K.A., Tollefsen D.M. The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation. *J Biol Chem* 1985; 260(6): 3501-3505.
97. Tovar A.M., de Mattos D.A., Stelling M.P. et al. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740(1): 45-53.
98. Kato H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(4): 539-548.
99. Ho G., Broze G.J., Jr, Schwartz A.L. Role of heparan sulfate proteoglycans in the uptake and degradation of tissue factor pathway inhibitor-coagulation factor Xa complexes. *J Biol Chem* 1997; 272(27): 16838-16844.
100. Vink H., Constantinescu A.A., Spaan J.A.E. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer. Implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; 101: 1500-1502.
101. Bode L., Eklund E.A., Murch S., Freeze H.H. Heparan sulfate depletion amplifies TNF- α -induced protein leakage in an in vitro model of protein-losing enteropathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(5): G1015-G1023.
102. Bode L., Murch S., Freeze H.H. Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. *J Biol Chem* 2006; 281(12): 7809-7815.
103. 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(9): 2062-2070.
104. Faraci F.M., Didion S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(8): 1367-1373.

105. Fukui T, Galis ZS, Meng XP. et al. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 101(10): 2101-2111.
106. Fukui T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002; 55(2): 239-249.
107. Максименко АВ. Внеклеточное окислительное поражение сосудистой стенки и ее ферментативная антиоксидантная защита. *Хим-фарм журн* 2007; 41: 2-12.
108. Kumagai R, Lu X, Kassab GS. Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radical Biol Med* 2009; 47: 600-607.
109. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6: 167-178.
110. Oliver MG, Specian RD, Perry MA, Granger DN. Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. *Inflammation* 1991; 15: 331-346.
111. Kurose I, Argenbright LW, Wolf R. et al. Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997; 272: H2976-H2982.
112. Kupinski AM, Shab DM, Bell DR. Transvascular albumin flux in rabbit hindlimb after tourniquet ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264: H901-H908.
113. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1672-H1680.
114. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H2247-H2256.
115. Beresewicz A, Czarnowska E, Maczewski M. Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the postischemic guinea-pig hearts. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 87-97.
116. Rebm M, Bruegger D, Christ F. et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 2007; 116(17): 1896-1906.
117. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(6): 853-876.
118. Nieuwdorp M, van Haften TW, Gouverneur MC. et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 2006; 55: 480-486.
119. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J. et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1127-1132.
120. Brower JB, Targovnik JH, Caplan MR, Massia SP. High glucose-mediated loss of cell surface heparan sulfate proteoglycan impairs the endothelial shear stress response. *Cytoskeleton* 2010; 67: 135-141.
121. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006; 37(7): 1923-1932.
122. Noble ML, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *QJM* 2008; 101(7): 513-518.
123. van den Berg BM, Spaan JA, Vink H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflugers Arch* 2009; 457(6): 1199-1206.
124. Meuwese MC, Mooij HL, Nieuwdorp M. et al. Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2009; 50(1): 148-153.
125. Fuki IV, Kubn KM, Lomazov IR. et al. The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1611-1622.
126. Meuwese MC, Stroes ESG, Vink H, van den Berg B. Continuous infusion of hyaluronidase reduces systemic glycocalyx volume and associates with increased molecular clearance [meeting abstract]. *FASEB J* 2008; 22: 924.20.
127. Hartvigsen K, Chou MY, Hansen LF. et al. The role of innate immunity in atherogenesis. *Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S388-S393.
128. Cbi Z, Melendez AJ. Role of cell adhesion molecules and immune-cell migration in the initiation, onset and development of atherosclerosis. *Cell Adh Migr* 2007; 1(4): 171-175.
129. Henry CB, Duling BR. TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2815-H2823.
130. Marechal X, Favory R, Joulin O. et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock* 2008; 29(5): 572-576.
131. Lortat-Jacob H, Grosdidier A, Imbert A. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(3): 1229-1234.
132. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(4): H1282-H1291.
133. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14(8): 351-360.
134. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Miranda-Filloo JA. et al. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* 2006; 60(10): 673-677.
135. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Garcia-Porrua C. et al. Effect of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on the progression of subclinical atherosclerosis in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 55(1): 150-153.
136. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL. et al. Tumor necrosis factor- α inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis* 2009; 202(1): 296-303.