Эндотелиальный гликокаликс крыс участвует в нарушениях микроциркуляторного русла

Максименко А.В.¹, Турашев А.Д.¹, Федорович А.А.², Тищенко Е.Г.¹, Рогоза А.Н.²

¹Институт экспериментальной кардиологии, ²Институт клинической кардиологии имени А.А.Мясникова Федерального Государственного Учреждения «Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс» Минздравсоцразвития Российской Федерации, Москва

Абстракт

Ковалентная модификация бычьей тестикулярной гиалуронидазы хондроитинсульфатом меняла противоположным образом характер гликирования нативного и модифицированного фермента нейтральными сахаридами и N-ацетилгексозаминами. Моно- и дисахариды сильнее инактивировали нативную гиалуронидазу, чем модифицированную хондроитинсульфатом. Взаимодействие с N-ацетилгексозаминами давало обратную картину: модифицированная гиалуронидаза инактивировалась сильнее нативной. Такие свойства превращали нативную и модифицированную гиалуронидазу в информативную исследовательскую ферментную тест-систему для определения іп vivo доминирующего вида сахаридных агентов в кровотоке (например, при нарушениях углеводного обмена или при деструкции гликокаликса). Данные взаимодействия гиалуронидазных производных с фрагментами гиалуронана и их смесью подтвердили возможность такой оценки. На модели постишемической перфузии конечности крысы следили за восстановлением уровня микроциркуляции с помощью метода лазерной допплеровской флоуметрии с участием ферментных производных и их компонентов. Нативная гиалуронидаза ускоряла восстановление исходного уровня микроциркуляции, а модифицированный фермент значительно ингибировался продуктами деградации гликокаликса. Полученные данные свидетельствуют об участии эндотелиального гликокаликса в нарушениях микроциркуляции.

Ключевые слова: эндотелиальный гликокаликс, протеогликаны, гликозаминогликаны, гиалуронан, хондроитинсульфат, гиалуронидаза, продукты деградации гликокаликса, микроциркуляция, лазерная допплеровская флоуметрия, вейвлет-анализ, оптимальная реперфузия.

Список сокращений: ГУ – нативная гиалуронидаза, ХС – хондроитинсульфат, ГУ-ХС – модифицированная хондроитинсульфатом гиалуронидаза, ГУ + ХС – смесь гиалуронидазы с хондроитинсульфатом, ГАГ – гликозаминогликаны, БСА – бычий сывороточный альбумин, ЛДФ – лазерная допплеровская флоуметрия, ЭГ – эндотелиальный гликокаликс, МЦР – микроциркуляторное русло.

Flowmetric study with hyaluronidase and chondroitin sulfate demonstrates the partaking of endothelial glycocalyx in microcirculation disturbances

Maksimenko A. V., Turashev A. D., Fedorovich A. A., Tischenko E. G., Rogoza A. N.

Abstract

Modification of bovine testicular byaluronidase with chondroitin sulfate altered on the contrary the glycation character of native and modified enzyme with neutral and charged saccharide derivatives. Monoand di- saccharides inactivated more the native enzyme than modified biocatalyst. The glycation with N-acethylhexosamines showed the counter picture: modified enzyme has been inactivated more then native by aluronidase. The reason of observed effect was related with interactions between N-acethylbexosamine (with reducing end) glycation agents, on the one hand, and modified hyaluronidase with altered surface electrostatic potential due to modification with chondroitin sulfate, on the other hand. These properties of byaluronidase derivatives gives us the informative research enzyme test for determination in vivo the dominant glycation agents in bloodstream and their origin. The interaction of hyaluronidase derivatives with hyaluronan fragments and their mixture has confirmed the opportunity of such evaluation. On the rat model of post ischemic perfusion of limb we evaluated the restoration of microcirculation level with help of laser doppler flowmetry method with application of enzyme derivatives and their components. After preventive administration the native by aluronidase accelerate the microcirculation restoration in post ischemic period of rat limb. Modified enzyme was inhibited with glycocalyx degradation products (with N-acethylbexosamines at reducing end) pronouncedly. The results of laser doppler flowmetry (after different schemes of assayed substance administration) warranted the participation of endothelial glycocalyx in microcirculation disturbances.

Key words: endothelial glycocalyx, proteoglycans, glycasaminoglycans, hyaluronan, chondroitin sulfate, hyaluronidase, glycocalyx degradation products, microcirculation, laser doppler flowmetry, wavelet analysis, optimal reperfusion.

Поражение сосудистой стенки обусловливает развитие большинства сердечно-сосудистых нарушений. Первым барьером, стоящим на ее защите, выступает, эндотелий и его гликокаликс [1, 2]. Гликокаликс рассматривается как инертный барьер, молекулярное сито, резервуар для биологически активных соединений, механотрансдуктор напряжения сдвига от потока крови на слой эндотелия [3, 4]. Основной состав гликокаликса (ЭГ) определяют мембранные (синдеканы и глипиканы) и растворимые (перлекан, бигликан и др.) протеогликаны и пять типов их гликозаминогликановых цепей (гепарансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат и гиалуроновая кислота) [5, 6]. Состав ЭГ не следует считать статичным. Имеется динамическое равновесие между растворимыми компонентами ЭГ и протекающей кровью, поэтому можно говорить об эндотелиальном поверхностном слое [7]. Таким образом, ЭГ представляется как самообновляющаяся трехмерная сеть из различных полисахаридных и белковых производных [5-8]. Деструкция ЭГ предстает одной из первых стадий сосудистого поражения [3-9] и вызывается активными формами кислорода [4, 9], ишемией [7, 9, 10], реперфузией [11, 12], обработкой ферментами [4, 5, 7, 9, 13]. Гликозидазные и протеолитические ферменты оказываются биохимическими регуляторами плотности гликокаликсного покрытия, влияющего на скорость кровотока. Острые нарушения последнего весьма серьезны и дают заметный вклад в показатель летальности от сердечно-сосудистых заболеваний [14]. Функциональное восстановление миокарда, после острого инфаркта, в 25% случаев возможно при достижении значимой реперфузии инфаркт-связанной артерии и установления адекватного уровня микроциркуляции и тканевой перфузии [15-17]. Таким образом, для успеха терапии необходимо добиться достоверно значимого уровня реперфузии в макро- и микро- циркуляторном русле [17-19]. Полагают, что ЭГ представлен на всех уровнях кровообращения и его толщина растет с увеличением диаметра сосуда [5]. В крупных сосудах ЭГ наглядно визуализируется методом двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии [20, 21]. Обоснованно предполагается, что дисфункция артериального ЭГ выступает одним из начальных этапов атеротромботического процесса [22-24].

Целью настоящего исследования было выявление участия ЭГ в микроциркуляторных нарушениях на модели ишемического поражения задней конечности крысы с регистрацией уровня подкожной микроциркуляции с помощью лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ).

Экспериментальная часть.

14

Материалы. В исследовании использовалась предварительно очищенная гель-хроматографически (сефадекс G-100, "Pharmacia", Швеция) [25] бычья

тестикулярная гиалуронидаза (КФ 3.2.1.35, лидаза) производства ФГУП "Микроген" МЗ РФ (Москва) со специфической активностью нативного производного 950-970 NFU/мг белка. Получение модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы (ГУ-ХС) выполнялось ранее указанным способом [26]. Специфическая активность модифицированного производного составляла 720-750 NFU/мг белка, степень модификации поверхностных аминогрупп фермента 84-86%, содержание белка в препарате 3-6% [27-29]. Другими использованными реагентами были калиевая соль гиалуроновой кислоты (гиалуронан) средней молекулярной массы 700-800 кДа из пуповины человека, хондроитин-4-сульфат (ХС) из трахеи быка со средней молекулярной массой 30-50 кДа, бычий сывороточный альбумин (БСА), D-глюкоза, D-галактоза, D-лактоза, D-мальтоза, D-целлобиоза, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин, хлористый натрий производства фирмы Sigma (США). Индивидуальные фрагменты (олигомеры) гиалуроновой кислоты общей формулы GlcA-[--GlcNHAc—GlcA--], ---GlcNHAc, где n равно 0 (димер), 1 (тетрамер), 2 (гексамер), 3 (октамер), 4 (декамер гиалуронана), были любезно предоставлены профессором Keiichi Takagaki, Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine (Япония) [30]. Остальные реактивы, компоненты буферных растворов были отечественного производства аналитической степени чистоты.

Методы. Эндогликозидазную активность производных гиалуронидазы (ГУ) определяли вискозиметрически с помощью вискозиметра Оствальда В-434 (Cannon, США) в соответствии с рекомендациями [31]. Для этого измеряли время истечения раствора из вискозиметра при 37°С. Конечная концентрация реагентов в растворе: гиалуроновой кислоты 0,06% в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5,5, содержащем 0,15 M NaCl, ГУ 0,002 мг/л (0,1 мл ферментной пробы из инкубационной смеси добавлялось к 0,9 мл раствора субстрата (гиалуроновая кислота), которые помещались в вискозиметр), моно- или дисахаридов, или N-ацетилгексозаминов – 0,2 мг/мл, гепарина – 0,2 мг/мл. Относительную вязкость рассчитывали как отношение времени истечения буферного раствора субстрата с добавленной ферментной пробой из инкубационной смеси ко времени истечения буферного раствора субстрата без фермента. Тангенс угла наклона прямой в координатах обратный логарифм относительной вязкости против времени инкубации/измерения пропорционален величине скорости ферментативной реакции [25]. Эта величина характеризует относительную величину скорости разложения ферментом субстрата, что сопоставляется с активностью стандартных препаратов ГУ (бычья тестикулярная гиалуронидаза, BTH, "Sigma", США /Н 3884/), выраженных в единицах формулярного стандарта/состава (NFU). Сравнительная удельная эндогликозидазная активность исследуемого очищенного препарата нативной ГУ составила 950-970 NFU/мг белка. Установленное значение активности ГУ производных представляет собой среднее значение трех экспериментальных измерений. Удельная активность предварительно очищенной нативной ГУ из семенников быка принимается за 100%.

Получение ГУ-ХС проводили согласно ранее описанной нами методике [26]. Содержание белка в нативном и модифицированном препаратах ГУ определяли по методу Брэдфорд [32]. Титрование поверхностных аминогрупп ГУ производных выполняли с помощью тринитробензолсульфоновой кислоты [25,33].

Оценка влияния ионной силы раствора на активность ГУ производных выполнялась путем вышеописанного измерения активности термостатированного при температуре 37°С буферного раствора нативного и модифицированного фермента с заданными аналитическими концентрациями хлорида натрия при значениях pH раствора 5,5 и 7,5, соответственно. Использовались следующие значения концентраций NaCl: 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, 0,75, и 1,0 М соответственно. Приведенные данные представляют среднее из трех экспериментальных измерений.

Модификацию ГУ производных осуществляли их инкубацией с избытком сахаридных форм (моно-, ди- сахаридами, N-ацетилгексозаминами, фрагментами гиалуронана с n = 0 - 4). Инкубацию ГУ производных вели в 0,05 М фосфатном буфере рН 5,5 или рН 7,5 (в присутствии 0,15 или 0,75 М хлористого натрия) при 37°С. Концентрация белка в растворе составила 0,02 мг/мл, а N-ацетилгексозамина (или другого сахаридного производного) 2 мг/мл, фрагментов гиалуронана не менее 0,01 мг/мл. В ходе инкубации (в присутствии 0.05% азида натрия и без него, различий не обнаружено) в течение восьми суток или четырех часов из реакционного раствора отбирались пробы по 0,1 мл и определялась их эндогликозидазная активность как описано выше. Время истечения из вискозиметра буферного раствора субстрата без и с добавлением к нему смеси гиалуронановых фрагментов практически не отличается друг от друга (в пределах погрешности измерения, ± 3 %), в течение всего периода четырехчасовой инкубации (pH 5,5, 37 °C) оно снижается не более чем на 3-4 % от исходного.

Резистентность ГУ производных к ингибированию гепарином оценивали по величине их остаточной эндогликозидазной активности в присутствии избытка гепарина (соотношение весовых концентраций гиалуронидаза/гепарин 1:100) [25, 26]. При одинаковой концентрации по белку (2 мкг/мл) в вискозиметре к реакционной смеси в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5,5, добавляли 0,2 мг/мл гепарина и (после 2-4 минут инкубации при комнатной температуре) измеряли эндогликозидазную активность ГУ производных вискозиметрически. Следует отметить, что время истечения буферного раствора субстрата практически не отличается (в пределах погрешности измерения) от времени истечения буферного раствора субстрата с добавлением гепарина. Приведенные значения представляют среднее из трех экспериментальных измерений.

Эксперименты in vivo. В экспериментах использовали крыс - самцов линии Вистар средней массы 320-400 грамм. Все эксперименты выполнены на анестезированных хлороформом животных. Ишемию задней конечности крыс вызывали путем ее пережатия с помощью лавсановой тесемки в районе сочленения голени и бедренной области. Регистрацию параметров тканевой перфузии проводили на основе лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) с использованием одноканального лазерного анализатора кожного кровотока ЛАКК-02 (НПП «ЛАЗМА», Россия) в красной области спектра (λ=630 нм), что позволяет оценивать параметры микроциркуляторного кровотока на глубине не более 1 мм (1,0-1,5 мм3 ткани). Этот метод, высоко чувствительный к изменениям микрогемодинамической ситуации, имеет преимущества перед другими методами исследования микроциркуляции, поскольку регистрирует не только объемноскоростные параметры микрокровотока, но и позволяет проводить изолированную оценку вклада каждого функционального механизма управления микрокровотоком.

Датчик красного лазера фиксировали перпендикулярно поверхности кожи на стопе левой тазовой конечности крысы в районе межпальцевых бугорков. Исследование влияния внутривенного введенных препаратов (1 мл раствора в хвостовую вену крысы) на время восстановления исходного уровня микроциркуляции проводили по схеме 1 - введение исследуемых препаратов за минуту до начала трехчасовой ишемии (системное действие) и схеме 2 – введение исследуемых препаратов за пять минут до окончания трехчасовой ишемии (острое действие). В контрольных экспериментах внутривенно вводился эквивалентный объем физиологического раствора. Регистрация уровня микроциркуляции осуществлялась до, во время и после окончания ишемии. В соответствии с критерием достижения исходного уровня микроциркуляции в течение пяти минут после окончания периода ишемии были сформированы группы сравнения животных (Таблица 1) со сходными результатами внутри групп.

Вейвлет-анализ экспериментальных данных. Полученные значения уровня микроциркуляции в зависимости от времени были таблично представлены с интервалом 60 сек для пятиминутного отрезка измерения исходной микроциркуляции и интервалом 30 сек для процесса ее восстановления после ишемии (в течение 10 или 20 минут). Затем они были пересчитаны как соотношение текущего показателя в данный момент времени к усредненному показателю начального уровня Таблица 1. Исследованные производные, дозы их препаратов и количество животных в группах сравнения.

Введенный препарат	Схема 1		Схема 2	
	Доза	Количество животных	Доза	Количество животных
Контроль (физиологический раствор)	1 мл	6	1 мл	6
Нативная гиалуронидаза	3 мг белка/кг (2800-2900 NFU/ кг веса)	6	3 мг белка/кг (2800-2900 NFU/ кг веса)	6
Модифицированная хондроитинсульфатом гиалуронидаза	3 мг белка/кг (2200-2300 NFU/ кг веса)	6	3 мг белка/кг (2200-2300 NFU/ кг веса)	6
Свободный хондроитинсульфат	5 мг/кг	6	5 мг/кг	6
Смесь хондроитин- сульфата с нативной гиалуронидазой	5 мг гликозамино- гликана/кг и 3 мг белка/кг (2800- 2900 NFU/кг веса)	6	5 мг гликозамино- гликана/кг и 3 мг белка/кг (2800- 2900 NFU/кг веса)	6
Бычий сывороточный альбумин	3 мг белка/кг	4	3 мг белка/кг	3

микроциркуляции. Выделение пятиминутного интервала (минимально необходимого для расчета частот низкого диапазона) было выбрано для получения амплитудно-частотного спектра с помощью вейвлет-преобразования [34]. Полученный спектр разделяли на частотные области, соответствующие факторам модуляции кровотока – сердечному или дыхательному ритму, миогенному, нейрогенному и эндотелиальному [35] – для определения статистически значимых различий. При амплитудно-частотном анализе отраженного сигнала с использованием математического аппарата вейвлет-преобразования, механизмы модуляции микрокровотока формируют пять не перекрывающихся частотных диапазонов.

Применяемое для амплитудно-частотного анализа программное обеспечение LDF 2.2.0.507 позволяет оценивать активность различных механизмов модуляции микрокровотока в диапазоне до 1,5 Гц. В связи с тем, что у крыс частотные диапазоны функциональной активности звеньев модуляции микрокровотока отличны от значений у человека, и значительно превышают 1,5 Гц (активность кардиального ритма проявляется в диапазоне 4-5 Гц), мы объективно оценивали функциональную активность только тонус формирующих («активных») звеньев модуляции микрокровотока. У крыс функциональная активность эндотелиального ритма проявляется в диапазоне 0,01-0,08 Гц, нейрогенного – 0,08-0,2 Гц, миогенного – 0,2-0,7 Гц [34, 35].

16

Статистическая обработка результатов. До-

стоверность различия набора данных оценивали с помощью непараметрического метода ANOVA Краскела-Уоллиса и медианного теста при сравнении частотных диапазонов между собой в каждом временном интервале различных групп (р ≤ 0,05) и внутри группы между временными интервалами по схеме 2. Определение статистически достоверных различий внутри частотных диапазонов по разным временным интервалам внутри группы осуществляли с использованием непараметрических методов критерия знаков и критерия Вилкоксона (для схемы 1) и рангового дисперсионного анализа по Фридману (ANOVA Фридмана, р < 0,05) с вычислением коэффициента конкордации Кендалла (для схемы 2). Медленное развитие эффектов в экспериментах, выполненных по схеме 2, обусловило выделение четырех временных интервалов для слежения за изменением амплитуды, а для схемы 1 – двух временных интервалов. Непараметрический метод ANOVA Краскела-Уоллиса (p <0,05) и медианный тест использовались также для сравнения времени достижения исходного уровня микроциркуляции по обеим схемам. Для подтверждения результатов о различии сравниваемых групп методом ANOVA Краскела-Уоллиса и исключения возможности возникновения проблемы множественных сравнений при использовании этого метода было проведено парное сравнение групп по каждой схеме с использованием непараметрического теста Манна-Уитни и использованием поправки Бонферрони при оценке значения р. Результаты были представлены в табличном виде с указанием для каждого теста количества объектов исследования в группах, медианы и границы 95% доверительного интервала, границы значения квартилей, название статистического теста и точного значения параметра р.

Результаты и обсуждение

Биохимическоое тестирование гликокаликса. Функционирование капилляров определяет деструкция одного из основных компонентов ЭГ – гиалуронана. Действительно, он детерминирует их проницаемость и межклеточные эндотелиальные контакты [4, 36]. Обработка микроциркуляторного русла гиалуронидазой подтвердила, что именно капиллярный ЭГ подкожной ткани хомяков является гиалуронан-зависимым [37]. На основании таких данных ГУ была выбрана нами как средство регуляции состояния ЭГ микроциркуляции. В естественных условиях ГУ функционирует в условиях окружения сахаридной природы, влияющей на ее эндогликозидазную активность и резистентность к гепариновому ингибированию [26]. Мы показали, что полимерные ГАГ (гиалуронан, ХС) стабилизировали фермент, а сополимерные (гепарин, дерматансульфат) дестабилизировали его. Инактивирующее влияние было связано с присутствием в микроокружении ГУ остатков идуроновой кислоты, α(1-3) и α(1-4) гликозидных связей. Наибольшим эффектом, стабилизирующим эндогликозидазную активность фермента, обладало хондроитин-сульфатное микроокружение биокатализатора [26]. В организме ГУ может взаимодействовать как с низкомолекулярными сахаридными производными в условиях нарушения углеводного обмена, так и с продуктами деградации ЭГ после ишемии/реперфузии, в условиях окислительного стресса. Такие взаимодействия изменяют активность фермента и отличаются действием либо нейтральных (моно-, дисахариды), либо заряженных (продукты деградации гликокаликса) сахаридных производных. Сравнительное гликирование ГУ и ГУ-ХС моно- (глюкоза и галактоза) и дисахаридами (мальтоза, целлобиоза, лактоза) продемонстрировало (Таблицы 2 и 3), что нативный фермент инактивируется больше и его резистентность к гепариновому ингибированию снижается заметнее, чем у модифицированного биокатализатора.

Таблица 2. Гликирование нативной гиалуронидазы (ГУ) моно- (глюкоза и галактоза), дисахаридами (мальтоза, целлобиоза, лактоза) и N-ацетилгексозаминами (N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином) в течение восьмисуточной инкубации (37оС, 0.15 M NaCl)

Состав инкубационной смеси	Параметры ГУ после восьми суток инкубации					
	pH 5,5		рН 7,5			
	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)		
ГУ	80	72	82	68		
ГУ с глюкозой	85	33	70	44		
ГУ с галактозой	65	55	80	60		
ГУ со смесью глюкозы и галактозы	61	54	66	60		
ГУ с мальтозой	88	23	96	28		
ГУ с целлобиозой	99	14	95	12		
ГУ с лактозой	58	14	71	15		
ГУ со смесью мальтозы, целлобиозы и лактозы	57	2	56	1		
ГУ с N-ацетил- глюкозамином	78	68	80	70		
ГУ с N-ацетил- галактозамином	88	78	86	77		
ГУ со смесью N-ацетилглюкоз- и N-цетилгалактозамина	70	60	80	70		

Таблица 3. Гликирование модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы (ГУ-ХС) моно- (глюкоза и галактоза), дисахаридами (мальтоза, целлобиоза, лактоза) и N-ацетилгексозаминами (N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином) в течение восьмисуточной инкубации (37оС, 0,15 M NaCl).

	Параметры ГУ после восьми суток инкубации				
Состав	pH 5,5		рН 7,5		
инкубационной смеси	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)	Сохраняемая активность (% от исходной)	Сохраняемая активность в присутствии избытка гепарина (% от исходной)	
ГУ -ХС	92	90	98	98	
ГУ –ХС с глюкозой	96	93	87	97	
ГУ –ХС с галактозой	100	95	98	96	
ГУ -XC со смесью глюкозы и галактозы	85	88	82	83	
ГУ –ХС с мальтозой	96	81	100	87	
ГУ –ХС с целлобиозой	88	71	91	75	
ГУ –ХС с лактозой	75	66	72	72	
ГУ –ХС со смесью мальтозы, целлобиозы и лактозы	75	66	72	72	
ГУ -XC с N-ацетил- глюкозамином	44	33	12	4	
ГУ -XC с N-ацетил- галактозамином	50	37	38	25	
ГУ -ХС со смесью N-ацетилглюкоз- и N-цетилгалактозамина	42	31	18	6	

Экранирующее действие хондроитин-сульфатного микроокружения стабилизировало фермент против гликирования нейтральными моно- и дисахаридами, сохраняя эндогликозидазную активность и подвергая белок другому типу конформационных изменений, сходных с происходящими при гликировании ГУ смесью сахаридов [27, 28]. Взаимодействие ГУ производных с N-ацетилгексозаминами обнаружило (Таблицы 2 и 3), что модифицированная форма ГУ инактивируется значительнее нативной и у первой заметнее падает резистентность к гепариновому ингибированию. Таким образом, эффекты N-ацетилгексозаминов оказались противоположны гликирующему действию нейтральных моно- и дисахаридов. Возможно, наблюдаемое различие обусловлено изменением электростатических взаимодействий в результате модификации ГУ отрицательно заряженным ХС. При этом можно ожидать снижения значения pl модифицированного белка, составляющего по расчетным данным 8,62 для нативной ГУ [38]. Однако эндогликозидазная активность ГУ в нативном

и модифицированном ХС виде зависит от величины ионной силы среды сходным образом (Рис. 1). Это оставляет возможность проявления более заметной роли поверхностных электростатических сил не в ходе катализа, а при модифицирующих взаимодействиях. Было найдено, что величина ионной силы среды практически не сказывается на эффектах нативного фермента и заметно влияет на инактивацию ГУ-ХС только на отдаленных сроках инкубации (Рис. 2). Отмеченная выше особенность, наряду с большим влиянием величины ионной силы при рН 7,5, чем при рН 5,5, а также сходство кривых инактивации гиалуронидазных производных на начальных сроках инкубации (Рис. 2) не позволяют считать лимитирующим действие электростатических сил. Очевидным становится влияние разных белковых конформаций у нативного и модифицированного фермента (кривая 4, действительно, не достигает сходного положения с кривыми 1 и 2, Рис. 2), их разной зависимостью от pH (разная форма и расположение кривых на Рис. 2, А и Б, соответственно), многоэтапного поРисунок 1. Влияние величины ионной силы среды (концентрация NaCl, M) на эндогликозидазную активность ГУ (1) и ГУ-ХС (2) при pH 5,5 (A) и pH 7,5 (Б).



Рисунок 2. Зависимость сохраняемой эндогликозидазной активности гиалуронидазных производных при взаимодействии со смесью N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина при pH 5,5 (A) и pH 7,5 (Б). Инкубацию проводили при величине ионной силы инкубационной среды 0,15 M NaCl (ГУ – 1, гиалуронидаза, ГУ-ХС – 3) и 0,75 M NaCl (ГУ – 2, ГУ-ХС – 4).



лучения разнообразных продуктов гликирования (Рис. 3, А), особенно после продолжительной инкубации [25-29]. К тому же, в препарате бычьей тестикулярной ГУ возможна минорная примесь сопутствующего фермента – N-деацетилазы, способствующей превращению N-ацетилглюкозамина (Рис. 3, Б) в глюкозамин [39]. Ингибирование активности щелочной фосфатазы, действительно, достигалось действием глюкоз- и галактозаминов [40]. В указанном выше многообразии взаимодействий основным становится присутствие в системе самих N-ацетилгексозаминов. Они легко гликируют амидную группу аспарагина в овальбумине [41], в поверхностном S-слое Halobacter halobium [42], многообразно взаимодействуют с белками [43]. В кровотоке N-ацетилгексозамины присутствуют только в составе ЭГ и продуктов его деградации. Таким образом, при взаимодействии in vivo с нативной и модифицированной ГУ N-ацетилгексозамины становятся своеобразной естественной «меткой» появляющихся при сосудистых повреждениях продуктов деградации ЭГ (Рис. 3, Б). Заметим, что именно по карбонилу восстанавливающего конца гиалуронановых олигосахаридов осуществлялось ковалентное присоединение к ним флуоресцентной метки (2-аминобензойной кислоты) [44]. Олигосахариды гиалуронана, молекулярной массой менее 2,5 kDa, ингибировали активность фосфоинозитид 3-киназы, тогда как более крупные (80 или 2000 kDa) не оказывали такого действия [45].

Взаимодействие производных ГУ с фрагментами гиалуронана общей формулы GlcA--[--GlcNHAc—GlcA--]n--GlcNHAc, где n от 0 до 4, продемонстрировало, что ГУ-ХС существеннее инактивируется в сравнении с ГУ (Рис. 4). С увеличением длины сахаридной цепи гиалуронановых фрагментов инактивация уменьшалась для ГУ и ГУ-ХС. С увеличением времени инкубации (рН 5,5, 37°С) заметнее

Рисунок 3. Схема гликирующих превращений при взаимодействии карбонила восстанавливающего сахаридного производного (как показано на примере глюкозы) с аминогруппой белка с многостадийным образованием ранних и конечных продуктов гликирования (А). Общая формула продукта деградации гиалуронана с N-ацетилглюкозамином у его восстанавливающего конца (Б).



20

усиливалась инактивация ГУ-ХС, особенно смесью фрагментов гиалуронана. За три часа инкубации снижалось количество титруемых поверхностных аминогрупп ГУ на 50%, а ГУ-ХС на 34%. Наблюдаемые эффекты наглядно подтверждали преобладающее инактивирующее действие N-ацетилгексозаминов (Рис.3, Б) на ГУ-ХС. Смесь гиалуронановых фрагментов моделировала действие смеси продуктов деградации ЭГ.

Итак, по характеру влияния на ГУ или ГУ-ХС при патологиях, связанных с появлением в кровотоке сахаридных производных, можно судить об их доминирующей фракции. Действие производных ГУ специфически направлено на ЭГ, они функционируют в ГАГ микроокружении, которое способно регулировать их активность и вызывать противоположные парные ответы при взаимодействии с разными типами сахаридных производных. Это позволяет определить участие в развитии сосудистых нарушений как нейтральных сахаридов, так и продуктов деградации ЭГ [13]. Последнее вполне актуально при нарушениях микроциркуляции [4] и может быть проанализировано in vivo с помощью ГУ и ГУ-ХС. На основании этого ГУ была выбрана и приготовлена нами для такого тестирования на модели нарушения микроциркуляции задней конечности крысы с помощью метода ЛДФ.

Модель поражения микроциркуляции крысы. Выбор нижней конечности крысы для изучения модели ишемического поражения микроциркуляции был обусловлен доступной возможностью слежения за изменением уровня подкожной микроциркуляции во времени с помощью метода ЛДФ. Для выбора оптимального времени ишемии была выполнена оценка скорости восстановления перфузии крысиной конечности и изменения формы кривой гиперемического отклика в интервале ишемии от 5 мин до 5 часов. При коротком ишемическом воздействии (5 мин) было отмечено быстрое восстановление микроциркуляции выше исходного уровня с характерным пиком гиперемической реакции, реализующимся в интервале до 1 мин. Ишемия продолжительностью З часа демонстрирует сравнительно замедленное восстановление микроциркуляции до исходного уровня, а также плавный и продолжительный гиперемический отклик, развивающийся на протяжении 20 минут постишемического периода (Рис. 5). Такая продолжительность ишемии позволяет достигать исходного уровня микроциркуляции в течение более долгого (две-три минуты) периода, что было недостижимо после короткой (5 мин – 1 час) ишемии и удобно для оценки эффектов исследуемых соединений. В таких условиях, выбранный период ишемии не способствует развитию интерстициального отека и необратимого разрушения микроциркуляторного русла [46]. Нарушения микроциркуляции могли быть связаны в этих условиях с "реперфузионным" поражением (ишемия/реперфузия), эндотелиальным набуханием, вазоспазмом, воспалительным ответом [47]. Установленный интервал (2.3-3.5 мг белка/кг веса животного, 2200-3400 NFU/г) белковой дозы (Таблица 1) ГУ соответствовал ее оптимальному эффекту и в этих границах (с учетом содержания компонентов в ГУ-ХС) сравнивалось действие изученных веществ. Перед проведением основного этапа исследования

Рисунок 5. Характер кривых восстановления уровня микроциркуляции крысиной конечности после ишемического воздействия длительностью 5 мин и 3 часа, оцененный с помощью ЛДФ-метрии.

нами была выполнена проверка влияния нативной и модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы на показатель микроциркуляторной системы кожи конечности крысы. Внутривенное введение указанных препаратов приводило к незначительному снижению показателя перфузии, возможно, в результате развития гемодилюции после введения рабочего объема препаратов, без последующих изменений этого параметра [48].

Вейвлет-анализ экспериментов in vivo, проведенных по схеме 1. Данные флоуметрии, касающиеся развития микроциркуляторного кровотока в постишемическом периоде (Рис. 6), с помощью вейвлет-преобразования были трансформированы в форму амплитудо-частотного спектра колебаний сосудов микроциркуляции в активном (Рис. 7).

Среди регуляторных механизмов на уровне микроциркуляторного сосудистого русла (МЦР) выделяют пассивные и активные звенья модуляции кровотока. К пассивным относят внешние факторы, находящиеся вне МЦР. Это пульсовая волна, которая приходит со стороны терминальных артерий и проецируется на уровне артериолярного звена сосудистого русла. На выходе из МЦР проявляется присасывающее действие «дыхательного насоса», которое проецируется на уровне венулярного отдела. Пассивные механизмы (пульсовая и эндотелиальная волны) организуют «продольные» колебания кровотока, выражающиеся в периодическом изменении объема крови в микрососудистом ложе [49].

Активные механизмы непосредственно воздействуют на сосуды МЦР путем периодического изменения сопротивления сосудов потоку крови посредством вазомоций [50, 51] и создают поперечные колебания кровотока. Эти факторы реРисунок 6. Флоуметрические данные восстановления исходного уровня микроциркуляции крысы при внутривенном болюсном введении указанных средств (в 1 мл физиологического раствора) за минуту до начала трехчасовой ишемии (схема 1). Экспериментальные группы животных (n = 6): 1 – контрольная (физиологический раствор), 2 – ГУ, 3 – ГУ-ХС, 4 – свободный ХС, 5 – смесь ГУ + ХС. Представленные кривые получены по медианному показателю экспериментальных данных.

гуляции модулируют поток крови со стороны сосудистой стенки и реализуются через ее мышечную составляющую, поэтому их еще называют тонус формирующими [49, 52]. Вазомоции осуществляются не только за счет синхронизированных спонтанных осцилляций гладкомышечных элементов сосудистой стенки (миогенный ритм), но и за счет их модуляции со стороны симпатической нервной регуляции (нейрогенный ритм) и эндотелий зависимой (эндотелиальный ритм) регуляции [50, 53].

В результате чередования сокращения и расслабления гладкомышечного аппарата сосудистой стенки (активные факторы) происходит модулирование периодически изменяющегося объема крови (пассивные факторы), что формирует оптимальные для транскапиллярного обмена гемодинамические параметры кровотока.

В рамках частотных диапазонов активных факторов регуляции микроциркуляции достоверность различий определялась (в пределах двух временных отрезков: от 0-300 сек и 300-600 сек) для показателя амплитуды сигнала в выбранном временном отрезке, отнесенном к исходному значению амплитуды этой области до ишемии (нормирование в % для каждой крысы в соответствующей группе). Оказалось, что статистически значимые различия (p < 0,05) обнаружены для нейрогенного и миогенного интервалов (Рис. 7) в контрольной группе. На уровне сосудов кожи колебания в нейрогенном интервале характеризуют симпатические адренергические механизмы регуляции микроциркуляции клетками артериол и артериоловенулярных анастомозов. Колебания в миогенном интервале отвечают состоянию мышечного тонуса прекапилляров, регулирующих приток крови из Рисунок 7. Вейвлет-спектры эндотелиального, нейрогенного и миогенного диапазонов колебаний (на заднем плане) и коробочное представление (по квартилям 25% и 75% отклонений в интервале значений измеряемого параметра, отрезками показаны минимальные и максимальные значения, п – величина медианы) измерений нормированной амплитуды сигнала во временных отрезках 0-300 и 300-600 сек для указанных экспериментальных групп животных (схема 1).

артериол в микроциркуляторное русло. Достоверный рост амплитуды сигнала в миогенном и нейрогенном интервале указывает на снижение в артериолах и прекапиллярах сопротивления кровотоку и увеличение его скорости при посткомпрессионной гиперемии [49]. Такие же изменения вызывает введение смеси ГУ + ХС, тогда как эффект ГУ и свободного ХС достоверно проявляется только в миогенном интервале (Рис. 7), а действие ГУ-ХС не дает достоверных различий ни в одном из диапазонов активных факторов регуляции микроциркуляции. Можно полагать, что ГУ как и свободный ХС проявляют восстанавливающий эффект посредством достоверного влияния на прекапилляры, а в смеси друг с другом – на прекапилляры и артериолы. Ковалентное присоединение XC к ГУ придает ей выраженное ингибирующее действие в отношении восстановления микроциркуляции после ишемии (Рис. 6 и 7).

Флоуметрическое рассмотрение данных экспериментов, выполненных по схеме 1. Время достижения исходного уровня микроциркуляции после компрессии крысиной конечности было разным для разных исследованных групп (Рис. 6). При проведении парного сравнения по тесту Мани-Уитни для определения достоверных различий по этому показателю между экспериментальными группами животных, сопоставляемых в ANOVA Краскела-Уоллиса, было найдено, что действие ГУ и ГУ-ХС достоверно отличаются между собой и от показателей других групп, тогда как показатели контрольной группы достоверно не отличались от показателей свободного ХС и его смеси с ГУ (Рис. 8). ГУ достоверно ускоряла восстановление микроциркуляции, а ГУ-ХС достоверно замедляла его, подчеркивая роль люминальной выстилки микрососудов.

ЭГ, как известно, выступает фактором резистентности кровотоку, транспортным сетевым барьером для трансэндотелиального передвижения молекул и пористым гидродинамическим партнером взаимодействия с клетками крови [4, 13]. Воздействие ишемии/ реперфузии, воспалительных процессов разрушает ЭГ в венулах и капиллярах [10, 11].

Деструкция гиалуронана определяет функционирование капилляров [4, 36, 37]. У системно появившегося в кровотоке ГУ производного (как в нашем изучении) имеется возможность воздействовать на гиалуронан ЭГ [13] и подвергаться действию метаболитов карбогидратного окружения [9]. В условиях продолжительной ишемии в их роли могут выступать продукты деградации ЭГ [4]. Свидетельством первого направления взаимодействия выступает снижение резистентности кровотоку микрососудов, а второму – ингибирование ферментативной активности. При этом нейтральные сахариды инактивируют нативную ГУ [27, 28], а заряженные олигомерные формы продуктов ГАГ деградации ЭГ (с N-ацетилгексозаминами у восстанавливающего конца) – ГУ-ХС [29]. Данные

вейвлет-анализа (Рис. 6) показывают уменьшение микрососудистой резистентности кровотоку в случае ГУ, поддерживаемое в смеси действием свободного ХС (достоверный рост амплитуды в нейрогенном и миогенном интервале - снижение резистентности кровотоку [34, 35]). Флоуметрическое же изучение демонстрирует достоверный эффект ускорения (относительно контроля) восстановления уровня микроциркуляции после ишемии (Рис. 6 и 8) только с ГУ. Можно полагать, что наблюдаемый эффект обусловлен ее эндогликозидазной активностью, поскольку использование другого белка, без указанной активности, БСА (способного к проникновению через нарушенные эндотелиальные контакты [54]), не оказывает отмеченного действия (Рис. 8). Более того, ГУ-ХС проявляет "тормозящий" эффект (относительно контроля) на скорость восстановления уровня микроциркуляции после ишемии (Рис. 6 и 8). Он свидетельствует об ингибировании ферментативной активности, повидимому, в результате действия продуктов деградации ЭГ с расположенными у их восстанавливающего конца N-ацетилгексозаминами и, возможно, об организации дополнительных барьеров микрокровотоку после ишемии (Рис. 6). Полученные данные демонстрируют участие ЭГ в микроциркуляторных нарушениях, устранение которых ускоряется при активном ферментативном воздействии на его компоненты. Вероятно, такое воздействие будет более затруднительным при остром введении производных (перед окончанием ишемии), когда накоплены продукты деградации (в зоне продолжительной ишемии) для проявления их "ударного" действия, гиперемия сокращает дозу активного фермента в очаге поражения (нет системного распределения производного) и исключается возможность функционирования введенных соединений в период ишемии. Для прояснения ситуации были выполнены эксперименты по схеме 2 (см. экспериментальную часть).

Вейвлет-анализ экспериментов in vivo, проведенных по схеме 2. Действительно, данные флоуметрии (Рис. 9) и полученные на их основе вейвлет-спектры амплитудно-частотных диапазонов активных факторов регуляции микрокровотока (Рис. 10) представляли другую картину при проведении экспериментов по схеме 2, чем по схеме 1. В контрольной группе достоверные изменения амплитуды сигнала, статистически сопоставляемые в четырех временных отрезках: 0-300, 300-600, 600-900 и 900-1200 сек, значимо различались в эндотелиальном и миогенном диапазонах (Рис. 10). Это свидетельствовало о непрерывном миогенном ответе гладкомышечных клеток сосудистой стенки на изменение внутрисосудистого давления [34] и метаболической активности эндотелия при этом [35]. Слой эндотелиальных клеток действует как источник некоторых вазоактивных веществ и играет ключевую роль в регуляции кровотока. В качестве дилатирующего агента могут выРисунок 8. ХСравнение экспериментально определенного времени достижения исходного уровня микроциркуляции в коробочной форме (по квартилям 25% и 75% отклонений в интервале значений измеряемого параметра, □ – величина медианы) для экспериментальных групп животных, которым вводились указанные соединения по схеме 1. Достоверность различий (p < 0.05) по ANOVA Краскела-Уоллиса и медианному тесту указана в тексте. Группы: контрольная, введение ГУ, ГУ-ХС, свободного ХС, смеси ГУ + ХС, БСА.

Рисунок 9. Флоуметрические данные восстановления исходного уровня микроциркуляции крысы при внутривенном болюсном введении указанных средств (в 1 мл физиологического раствора) за пять минут до окончания трехчасовой ишемии (схема 2). Экспериментальные группы животных (n = 6): 1 – контрольная (физиологический раствор), 2 – ГУ, 3 – ГУ-ХС, 4 – свободный ХС, 5 – смесь ГУ + ХС. Представленные кривые получены по медианному показателю экспериментальных данных.

ступать оксид азота (NO) [55-57] и эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF), играющий заметную роль в функционировании микроциркуляции, особенно артериол коронарных сосудов [57], а также в условиях окислительного стресса [58]. Болюсное внутривенное введение исследуемых производных (т.е. за пять минут до окончания периода ишемии, схема 2), обнаружило, что в случае ГУ достоверность различий имеется в миогенном и нейрогенном диапазонах, а для ГУ-ХС, свободного ХС и его смеси с ГУ + ХС – во всех трех диапазонах (Рис. 10). В последней ситуации наблюдается достоверный рост амплитуды сигнала в миогенном и нейрогенном диапазонах, свидетельствующий о снижении жесткости сосудистой стенки и резистентности кровотоку наряду с увеличением метаболической активности эндотелия. При разных режимах кожной поверхностной компрессии отмечалось, что эндотелиальный фактор регуляции микроциркуляции, способствуя дилатации сосудов и снижению их жесткости, противодействовал нейрогенному и миогенному повышению жесткости микрососудов и повышению их резистентности кровотоку [34]. Подобное действие потока крови отмечалось и в наших контрольных экспериментах при продолжительности реперфузии более 900 сек (Рис. 10), нивелируя отмеченное противодействие при введении ГУ-ХС, свободного ХС и ГУ + ХС. Естественно предположить, что такое действие миогенного и нейрогенного факторов, совпадающее с направленностью развития эндотелиальных эффектов, носит компенсаторный характер и обусловлено дополнительной нагрузкой [59]. Такие данные получены и для экзогенных ГАГ (гиалуронана, гепарина, гепарансульфата, ХС) [9], причем экзогенные фрагменты гиалуронана (начиная с декасахаридов и выше) вытесняли гиалуронан с клеточной поверхности, а ХС таким эффектом не обладал, накапливаясь в ЭГ [4, 60, 61]. Введенный внутрикоронарно за пять минут до окончания ишемии у свиней меченый декстрансульфат (как аналог ГАГ) локализовался на поверхности пораженного сосуда миокарда, снижая размер инфаркта у животных [62]. Можно полагать, что ГУ-ХС, свободный ХС, его электростатический комплекс с нативной ГУ задерживаются в реперфузионный период в гликокаликсной сети, увеличивая резистентность открывшемуся кровотоку и обусловливая компенсационный вазодилатирующий вклад миогенного и нейрогенного факторов в развитие реперфузии (Рис. 10).

Флоуметрическое рассмотрение данных экспериментов, выполненных по схеме 2. Флоуметрическое изучение демонстрирует решающий вклад самого потока крови в достижение исходного уровня микроциркуляции после трехчасовой ишемии (Рис. 9). Статистическая обработка этих данных показывает достоверность сходства результатов контрольного эксперимента и эффекта ГУ, от которых достоверно отличаются сходные между собой "тормозящие" восстановление кровотока эффекты ГУ-ХС, свободного ХС и ГУ + ХС (Рис. 11). Действие БСА подчеркивает значимость ГУ активности, которая, по-видимому, направлена на измененную ишемией структуру ЭГ и снижается при функционировании нативного фермента Рисунок 10. Вейвлет-спектры эндотелиального, нейрогенного и миогенного диапазонов колебаний (на заднем плане) и коробочное представление (по квартилям 25 % и 75 % отклонений в интервале значений измеряемого параметра, отрезками показаны минимальные и максимальные значения, □ – величина медианы) измерений нормированной амплитуды сигнала во временных отрезках 0-300, 300-600, 600-900 и 900-1200 сек для указанных экспериментальных групп животных (схема 2).

* – достоверность различий (p < 0.05) ранговому дисперсионному анализу (ANOVA Фридмена) с вычислением коэффициента конкордации Кендалла.

в ишемизированной зоне микроциркуляции. Это влияние сказывается на действии смеси ГУ + ХС, обнаруживая, возможно, присутствие увеличенного количества нейтральных сахаридных производных. Доминирующее накопление заряженных продуктов деградации ЭГ инактивирует ГУ-ХС и ее электростатические комплексы с ХС, подтверждая участие ЭГ в развитии микроциркуляторных событий. Кроме того, возможное удержание ЭГ хондроитинсульфата и его ковалентных и электростатических комплексов с ГУ достоверно тормозит восстановление микроциркуляции (Рис. 11), вероятно, благодаря организации гидродинамических препятствий кровотоку. Сравнение данных разных экспериментальных схем (Рис. 8 и 11) подтверждает вероятность такой ситуации, указывая на антиишемическую защиту поверхности микрососудов свободным ХС и ГУ + ХС. Полученные результаты поддерживают рассмотрение ЭГ (эндотелиального поверхностного слоя) как важной терапевтической мишени [7].

Рисунок 11. Сравнение экспериментально определенного времени достижения исходного уровня микроциркуляции в коробочной форме (по квартилям 25% и 75% отклонений в интервале значений измеряемого параметра, □ – величина медианы) для экспериментальных групп животных, которым вводились указанные соединения по схеме 2. Достоверность различий (p < 0.05) по ANOVA Краскела-Уоллиса и медианному тесту указана в тексте. Сокращения как в подписи к Рис. 8.

Заключение

Полученные результаты демонстрируют, что ферментативное воздействие нативной ГУ на компонент ЭГ - гиалуронан, в превентивном режиме с последующей ишемией (схема 1), способствует достоверно ускоренному восстановлению уровня исходной микроциркуляции. Заряженные формы продуктов деградации ЭГ (с N-ацетилгексозаминами у восстанавливающего конца), появляющиеся при ишемии, в противоположность нативному ферменту, инактивируют его модифицированное ХС производное. "Ударное" действие накопленных при ишемии продуктов деградации ЭГ становится еще более выраженным при "остром" введении исследуемых соединений (схема 2). Инактивируется как ковалентный, так и электростатический комплекс ГУ с ХС. Данные вейвлет-спектров позволяют предполагать (схема 2) удержание гликокаликсом ГУ-ХС, свободного ХС и его комплекса с нативной ГУ, способствуя замедленному восстановлению исходного уровня микроциркуляции. Кроме того, в этих условиях теряется антиишемическая защита микрососудистой поверхности свободным ХС и его смесью с нативной ГУ. Тормозящее действие БСА в обеих исследуемых схемах эксперимента и инактивация продуктами деградации ЭГ модифицированной ГУ указывают на значимость стабильной ГУ активности для скорейшего восстановления адекватного уровня микроциркуляции. Полученные результаты свидетельствуют об участии ЭГ в микроциркуляторных нарушениях. Это обосновывает новые подходы к изучению и терапии случаев отсутствия "оптимальной" реперфузии у пациентов с острыми сердечно-сосудистыми поражениями.

Настоящее исследование по биоинженерному изучению in vivo эндотелиального гликокаликса микроциркуляции поддержаны Федеральной целевой научно-технической программой «Новейшие методы биоинженерии» направления «Инженерная энзимология» и «Биокаталитические технологии», грантами РФФИ 06-04-48058, 07-04-12057-офм, 09-04-00023, Росздравом, Росмедтехнологий, а также Минздравсоцразвития России.

Авторы благодарны профессору Keiichi Takagaki (Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan) за любезное предоставление олигомеров гиалуронана.

Списоклитературы

- 1. Rehm 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: 1896-1906.
- 2. Bruegger D., Rehm M., Jacob M. et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. Crit Care 2008; 12: R73-R84.
- *3.* Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano E.R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. Annu Rev Biomed Eng 2007; 9: 121-167.
- 4. Максименко А.В., Турашев А.Д. Гликокаликс и его фрагменты в функционировании микроциркуляции. Регионарное кровообращение и микроциркуляция 2009; 8: 4-13.
- 5. Broekbuizen LN, Mooij HL, Kastelein JJ. et al. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol 2009; 20: 57-62.
- 6. 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: 507-511.
- 7. Becker B.F., Chappell D., Bruegger D. et al. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. Cardiovasc Res 2010; 87: 300-310.
- 8. Reitsma S, Slaaf D.W, Vink H. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Pflugers Arch 2007; 454: 345-359.
- 9. Максименко А.В. Эффекты гликозаминогликанов в сосудистых событиях. Хим-фарм журн 2008; 42: 3-13.
- Mulivor A.W., Lipowsky H.H. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286: H1672-H1680.
- 11. Platts S.H., Linden J., Duling B.R. Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A2A receptor activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H2360-H2367.
- 12. Chappell D., Jacob M., Hofmann-Kiefer K. et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischemia/reperfusion. Cardiovasc Res 2009; 83: 388-396.
- 13. Максименко А.В., Турашев А.Д., Тищенко Е.Г. Подходы к регуляции углеводного покрытия люминальной поверхности сосудистой стенки для коррекции патофизиологических процессов. Мол мед 2008; № 2, 12-17.
- 14. Максименко А.В., Ваваев А.В. Ферментные антиоксиданты следующий этап фармакологического противостояния окислительному стрессу? Мол мед 2010; № 2, 9-14.
- 15. Maes A, Van de Werf F, Nuyts J. et al. Impaired myocardial tissue perfusion early after successful thrombolysis. Impact on myocardial flow, metabolism, and function at late follow-up. Circulation 1995; 92: 2072-2078.
- 16. Roe M.T., Ohman E.M., Maas A.C. et al. Shifting the open-artery bypothesis downstream: the quest for optimal reperfusion. J Am Coll Cardiol 2001; 37: 9-18.
- 17. Miura T., Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. Basic Res Cardiol 2008; 103: 501-513.
- 18. Wilson GJ, Diaz RJ. The myocardial no-reflow phenomenon: role of deltaPKC. Cardiovasc Res 2007; 73: 623-625.
- 19. Abbate A, Bussani R, Sinagra G. Right ventricular cardiomyocyte apoptosis in patients with acute myocardial infarction of the left ventricular wall. Am J Cardiol 2008; 102: 658-662.
- 20. van Zandvoort M, Engels W, Douma K. Et al. Two-photon microscopy for imaging of the (atherosclerotic) vascular wall: a proof of concept study. J Vasc Res 2004; 41: 54-63.
- 21. Megens R.T., Reitsma S., Schiffers 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.
- 22. Noble MI, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. QJM 2008; 101: 513-518.
- 23. van den Berg B.M., Vink H., Spaan J.A.. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. Circ Res 2003; 92: 592-594.
- 24. Galiuto L., Crea F. No-reflow: a beterogeneous clinical phenomenon with multiple therapeutic strategies. Curr Pharm Des 2006; 12: 3807-3815.
- 25. Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г. Модифицированная декстраном гиалуронидаза резистентна к ингибированию гепарином. Биохимия 2001; 66: 563-572.
- 26. Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г. Гликозаминогликановое микроокружение гиалуронидазы в регуляции ее эндогликозиданой активности. Биохимия 2003; 68: 1055-1062.
- 27. Турашев АД, Тищенко Е.Г., Максименко А.В. Гликирование нативной и модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы моносахаридами. Мол мед 2009; № 3: 51-56.
- 28. Турашев АД., Тищенко ЕГ., Максименко АВ. Неферментативное гликозилирование нативной и модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы дисахаридами. Мол мед 2009; №. 6: 50-55.
- 29. Турашев АД, Тищенко ЕГ, Максименко АВ. Определяют ли электростатические взаимодействия гликирование гиалуронидазных производных N-ацетилгексозаминами. Биомед химия 2011; (в печати).
- 30. Takagaki K., Kojima K., Majima M. et al. Ion-spray spectrometric analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. Glycoconj J 1992; 9: 174-179.
- *31. Vercruysse K.P., Lauwers A.R., Demeester J.M. Kinetic investigation of the action of byaluronidase on byaluronan using the Morgan-Elson and neocuproine assays. Biochem J* 1995; 306: 153-160.

- 32. Bradford M.M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
- 33. Sprado AA.C., Dragbetta W., Dellama S.N. et al. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. Anal Biochem 1979; 96: 317-321.
- 34. Humeau A, Ko tka A, Abraham P. et al. Time-frequency analysis of laser Doppler flowmetry signals recorded to a progressive pressure applied locally on anaesthetized healthy rats. Phys Med Biol 2004; 49: 843-857.
- 35. Li Z, Tam E.W., Kwan M.P. et al. Effect of prolonged surface pressure on the skin blood flowmotions in anaesthetized rats an assessment by spectral analysis of laser Doppler flowmetry signals. Phys Med Biol 2006; 51: 2681-2694.
- 36. Stevens A.P., Hlady V., Dull R.O. Fluorescence correlation spectroscopy can probe albumin dynamics inside lung endotbelial glycocalyx. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 293: L328-L335.
- 37. Cabrales P, V zquez BY, Tsai A.G., Intaglietta M. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. J Appl Physiol 2007; 102: 2251-2259.
- 38. http://www.uniprot.org/uniprot/Q7YS45.
- *39. Chen F., Kakizaki I., Yamaguchi M. et al. Novel products in hyaluronan digested by bovine testicular hyaluronidase. Glycoconj J* 2009; 26: 559-566.
- 40. Pollak A., Coradello H., Leban J. et al. Inhibition of alkaline phosphatase activity by glucose. Clin Chim Acta 1983; 133: 15-24.
- 41. Johansen P.G., Marshall R.D., Neuberger A. Carbohydrates in protein. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen egg ovalbumin. Biochem J 1961;78:518-527.
- 42. Lechner J., Wieland F. Carbohydrates in protein. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen egg ovalbumin. Annu Rev Biochem 1989; 58: 173-194.
- 43. Spiro R.G. Carbohydrates in protein. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from ben egg ovalbumin. Glycobiology 2002; 12: 43R-56R.
- 44. Seyfried N.T., Blundell C.D., Day A.J., Almond A. Preparation and application of biologically active fluorescent by aluronan oligosaccharides. Glycobiology 2005;15:303-312.
- 45. Ghatak S., Misra S., Toole B.P. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositid 3-kinase/Akt cell survival pathway. J Biol Chem 2002; 277: 38013-38020.
- 46. Bijnens B, Sutherland G.R. Myocardial oedema: a forgotten entity essential to the understanding of regional function after ischaemia or reperfusion injury. Heart 2008; 94: 1117-1119.
- 47. Jaffe R, Charron T, Puley G. et al. Microvascular obstruction and the no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention. Circulation 2008; 117: 3152-3156.
- 48. Hudetz A.G., Wood J.D., Biswal B.B. et al. Effect of hemodilution on RBC velocity, supply rate, and hematocrit in the cerebral capillary network. J Appl Physiol 1999; 87: 505-509.
- 49. Крупаткин А.И., Сидоров В.В.Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови.М.: Медицина, 2005. 254 с.
- 50. Funk W., Intaglietta M. Spontaneous arteriolar vasomotion. Prog Appl Microcirc 1983; 3: 66-82.
- 51. Kastrup J, Bulow J, Lassen NA. Vasomotion in human skin before and after local heating recorder with laser Doppler flowmetry. Int J Microcirc 1989; 8: 205-215.
- 52. Крупаткин А.И.Динамический колебательный контур регуляции капиллярной гемодинамики. Физиология человека 2007; 33: 95-103.
- *53. Kvernmo H.D., Stefanovska A., Kirkeboen KA. Kvernebo K. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. Microvasc Res 1999; 57: 298-309.*
- 54. Tarbell J.M. Shear stress and the endothelial transport barrier. Cardiovasc Res 2010; 87: 320-330.
- 55. Vanhoutte P.M. How we learned to say NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29: 1156-1160.
- 56. Edwards D.H., Li Y., Griffith T.M. Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca2+ mobilization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 1774-1781.
- 57. Liu Y, Gutterman D.D. Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles. Med Biol Eng Comput 2008; 46: 469-478.
- 58. Graier W.F., Hecker M. Endothelial H2O2: a bad guy turning good? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 1691-1693.
- *59. Maksimenko AV. Experimental antioxidant biotherapy for protection of the vascular wall by modified forms of superoxide dismutase and catalase. Curr Pharm Des 2005; 11: 2007-2016.*
- 60. Camaioni A, Hascall V.C., Yanagishita M, Salustri A. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. J Biol Chem 1993; 268: 20473-20481.
- 61. Wight T.N., Merrilees M.J. Proteoglycan in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. Circ Res 2004; 94: 1158-1167.
- 62. Banz Y., Hess O.M., Robson S.C. et al. Locally targeted cytoprotection with dextran sulfate attenuates experimental porcine myocardial ischaemia/reperfusion injury. Eur Heart J 2005; 26: 2334-2343.