HHS Public Access
Author manuscript
Compr Physiol. Author manuscript; available in PMC 2023 August 23.

Published in final edited form as:
Compr Physiol. ; 12(4): 3781–3811. doi:10.1002/cphy.c210029.

Endothelial Glycocalyx

Christopher A. Foote[1,2], **Rogerio N. Soares**[1], **Francisco I. Ramirez-Perez**[1], **Thaysa Ghiarone**[1], **Annayya Aroor**[3,4], **Camila Manrique-Acevedo**[1,3,4], **Jaume Padilla**[1,5], **Luis A. Martinez-Lemus**[1,2]

[1]Dalton Cardiovascular Research Center, University of Missouri, Columbia, MO, USA

[2]Department of Medical Pharmacology and Physiology, University of Missouri, Columbia, MO, USA

[3]Department of Medicine, University of Missouri, Columbia, MO, USA

[4]Harry S. Truman Memorial Veterans' Hospital, Columbia, MO, USA

[5]Department of Nutrition and Exercise Physiology, University of Missouri, Columbia, MO, USA

Эндотелиальный гликокаликс

Перевод А.А. Науменко
Южно-Сахалинск
2026 год

АННОТАЦИЯ

Гликокаликс представляет собой полисахаридную структуру, выступающую на поверхности клетки. Он состоит преимущественно из гликопротеинов и протеогликанов, которые обеспечивают клеткам коммуникацию, электростатический заряд, ионный буфер, проницаемость, а также способность к механочувствительности и механотрансдукции. В кровеносных сосудах эндотелиальный гликокаликс, выступающий в просвет сосуда, отделяет сосудистую стенку от циркулирующей крови. Такое расположение позволяет ряду его компонентов, включая сиаловую кислоту, глипикан-1, гепарансульфат и гиалуронан, участвовать в механочувствительности и механотрансдукции зависящего от кровотока напряжения сдвига, что приводит к синтезу оксида азота и опосредованной потоком вазодилатации. Эндотелиальный гликокаликс также участвует в регуляции сосудистой проницаемости и модуляции воспалительных реакций, включая роллинг и экстравазацию лейкоцитов. Его структурная организация и отрицательный заряд препятствуют связыванию и выходу из сосудистого русла макромолекул крупнее ~70 кДа и катионных молекул. Это также предотвращает экстравазацию таких патогенов, как бактерии и вирусы, а также опухолевых клеток. Поскольку гликокаликс постоянно подвергается воздействию напряжения сдвига и циркулирующих ферментов — таких как нейраминидаза, гепараназа, гиалуронидаза и матриксные металлопротеиназы — он находится в непрерывном процессе деградации и обновления. Смещение баланса в сторону деградации связано с целым рядом патологий, включая атеросклероз, гипертензию, сосудистое старение, метастатический рак и диабетические васкулопатии. В связи с этим современные исследования направлены на расшифровку механизмов, способствующих деградации гликокаликса или ограничивающих его синтез, а также на разработку терапевтических подходов, улучшающих целостность гликокаликса с целью снижения бремени сосудистых заболеваний.

ВВЕДЕНИЕ

Все живые клетки имеют прикреплённые внеклеточные полисахаридные структуры. Эти структуры выполняют множество функций для клеток, включая, но не ограничиваясь, создание физического и химического барьера, обеспечение межклеточной коммуникации, буферизацию внеклеточных соединений, механочувствительность и т. д. Гликокаликс — это универсальный термин, описывающий данную структуру, которая в разных типах клеток может иметь дополнительные более специфические названия, например, «zona pellucida» у млекопитающих в ооцитах. В сосудистом русле организмов млекопитающих выраженный гликокаликс присутствует на люминальной поверхности эндотелия, который благодаря своим известным ролям в функции и патофизиологии кровеносных сосудов привлёк значительное внимание в научной литературе. Именно эта сосудистая структура является предметом настоящего обзора.

Эндотелиальный гликокаликс непрерывно синтезируется эндотелиальными клетками и аналогично деградирует под действием как механических, так и биохимических стимулов. Он обеспечивает множество функций для кровеносных сосудов, включая роль полупроницаемого барьера для компонентов крови и роль механосенсора для генерируемых кровотоком сил напряжения сдвига. В данном обзоре мы представим углублённое рассмотрение состава эндотелиального гликокаликса. Мы также подробно остановимся на физиологических процессах, опосредуемых эндотелиальным гликокаликсом, включая регуляцию сосудистой проницаемости [35], механочувствительность и механотрансдукцию напряжения сдвига [330], генерацию оксида азота (NO) [18], защиту от клеточной адгезии/инфильтрации и воспаления [61]. Кроме того, мы представим обзор патофизиологических состояний, в патогенез которых вовлечена деградация гликокаликса, включая атеросклероз и воспаление, сепсис, гипертензию, старение, рак и диабет. Мы также рассмотрим суррогатные маркеры деградации гликокаликса и, где применимо, сравним эти подходы с прямой оценкой длины (или толщины, поскольку эти термины используются взаимозаменяемо для обозначения расстояния, на которое структуры гликокаликса выступают от поверхности клетки). Более того, мы осветим текущие подходы к терапевтическому воздействию на гликокаликс с целью его регенерации в контексте этих патологий. Наконец, мы включим обзор и оценку преимуществ и недостатков подходов, используемых для измерения гликокаликса и оценки его функции *ex vivo*, включая электронную [287] и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию [24], а также альтернативные подходы с использованием современной атомно-силовой микроскопии [275] и клинические подходы к измерению гликокаликса *in vivo* [212,250].

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Одно из самых ранних зарегистрированных наблюдений клеток было опубликовано в книге *Micrographia: or, some Physiological Descriptions of Minute Bodies made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries thereupon -Микрография: или некоторые физиологические описания мельчайших тел, сделанные с помощью увеличительных стекол, с наблюдениями и исследованиями по этому поводу* в 1665 году [116]. Автор, Роберт Гук [Robert Hooke], ввел термин «клетка» для описания отдельных единиц, составляющих сотовую структуру пробки, и заложил основу клеточной теории. Структурой, которую Гук смог наблюдать через свою примитивную линзу/микроскоп, была клеточная стенка растения, которая также имела покровную смесь преимущественно из лигнина и целлюлозы, последняя из которых представляет собой полисахарид, состоящий из субъединиц D-глюкозы. Неизвестное Гуку наличие внеклеточного богатого полисахаридами покрытия, по-видимому, является универсальной чертой всех клеток, независимо от филогенетического царства, и, следовательно, включает бактерии, грибы, растения и животных. Ходу научной истории пришлось ждать примерно 300 лет со времени публикации Гука до 1961 года,

когда структурное клеточное покрытие получило подходящее название и классификацию. Именно во время презентации рукописи Мексиканскому анатомическому обществу доктор Стэнли Беннет [Stanley Bennet] впервые предложил термин гликокаликс [glycocalyx] (от латинского sweet husk [сладкая шелуха]) для описания богатых полисахаридами клеточных компонентов и продуктов, находящихся снаружи от плазматической мембраны клетки [23,292]. Это новое название и классификация были важны, поскольку они отличали другие внеклеточные структуры от богатого сахарами покрова плазмалеммы, который обладает совершенно иными физическими свойствами. В настоящее время гликокаликс — это универсальный термин, описывающий сахаристый покров клеток и охватывающий множество названий, определяющих полисахаридный слой, специфичный для конкретного типа клеток, например: клеточная стенка, слизистое покрытие, zona pellucida, кутикула, антиген эритроцитов и т.д. Кроме того, на момент наблюдений Беннета уже предполагалось, что плазматическая мембрана ведет себя как жидкостно-мозаичная структура, состоящая из липидного бислоя, который функционирует как барьер, предотвращающий движение ионов и водорастворимых молекул. *Обзор исторического развития жидкостно-мозаичной модели см. в [171].* Гликокаликс, в отличие от плазматической мембраны, обеспечивает легкое прохождение водных растворенных веществ, но действует как фильтр как по размеру, так и по заряду молекул. Беннет проницательно заметил: *«…клеточная стенка может проявлять свойства неподвижной фазы хроматографической колонки. При наличии заряженных групп…это покрытие клетки может проявлять свойства ионообменной колонки»* [23]. Таким образом, благодаря своей способности избирательно фильтровать молекулы, гликокаликс может изменять и влиять на биохимический состав на границе раздела плазматической мембраны и внеклеточной среды. Это имеет глубокие последствия в сосудистой системе, где эндотелиальный гликокаликс действует как сигнальная платформа для поддержания здоровья сосудов и контроля сосудистой проницаемости [329].

СТРУКТУРА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЛИКОКАЛИКСА

Широко признано, что все клетки образуют богатое сахарами покрытие, которое подпадает под определение гликокаликса. Многие характеристики гликокаликса являются общими для всех клеток [125]. Однако здесь мы сосредоточимся на характеристиках эндотелиального гликокаликса и новых данных, указывающих на его центральную роль в функции сосудов.

В сердечно-сосудистой системе млекопитающих кровообращение непрерывно и бесперебойно. Тем не менее, сосуды, транспортирующие кровь по всему организму, можно разделить на три основных отдельных компартмента: артериальное кровообращение, капиллярное русло и венозное кровообращение [282]. Каждый компартмент выполняет свою физиологическую функцию. Артерии распределяют

кровь и метаболические/катаболические реагенты по различным капиллярным руслам. Капилляры представляют собой компартмент, в котором происходит обмен большинства метаболитов/катаболитов между кровью и тканями. Венозное кровообращение возвращает кровь и катаболические/метаболические продукты к сердцу, чтобы они были выброшены для последующего цикла. Благодаря близости к сердцу по направлению тока крови артериальное кровообращение подвергается гораздо более высокому внутрипросветному давлению и реологическим силам сдвига, чем капилляры и вены [94]. Это важно, поскольку силы сдвига играют преобладающую роль как в биосинтезе, так и в деградации гликокаликса, а также в его составе. Поэтому предполагается, что эндотелиальный гликокаликс в артериальном кровообращении не идентичен ни функционально, ни структурно таковому в капиллярном русле или венозном кровообращении [298]. Более того, поскольку силы сдвига распределены в артериальном дереве неравномерно (например, магистральные артерии в сравнении с резистивными артериями или ламинарный в сравнении с турбулентным характером потока) [272], существуют также различия в форме и функции эндотелиального гликокаликса в пределах артериального кровообращения. Однако, отчасти из-за трудностей, связанных с определением характеристик гликокаликса, не проводилось систематического исследования, детализирующего различия в эндотелиальном гликокаликсе при продвижении от сердца через различные циркуляторные компартменты. В качестве дополнительной оговорки, многие исследования, направленные на расширение нашего понимания эндотелиального гликокаликса, проводились на культивируемых клетках. Это позволило использовать методы, обеспечивающие лучшую характеристику гликокаликса, но также привнесло особенности, которые, вероятно, отличаются от его структурных и функциональных свойств *in vivo*.

Прежде чем перейти к структурному описанию эндотелиального гликокаликса, важно понять контекст, в котором гликокаликс синтезируется и функционирует в рамках базовой архитектуры кровеносных сосудов. Как принято, стенка артерий и вен состоит из трех отдельных слоев (**Рисунок 1**). От просвета кнаружи они располагаются следующим образом: внутренняя оболочка (интима), средняя оболочка (медиа) и наружная оболочка (адвентиция). Первый слой прилегает к просвету и кровотоку. Он содержит эндотелий и его базальную мембрану. Это также единственный слой, который образует стенку капилляра. Этот тонкий монослой эндотелиальных клеток во всех сосудах ориентирован по направлению кровотока и синтезирует компоненты гликокаликса. Он также продуцирует множество сигнальных молекул, которые передают сообщения нижележащему гладкомышечному слою медии в артериях и венах. Такие сообщения вызывают острые и хронические реакции сосудистой стенки, которые отвечают за вазоконстрикцию, вазодилатацию, ремоделирование и воспаление, среди многих других процессов. *Более подробный обзор сосудистого эндотелия см. [2].*

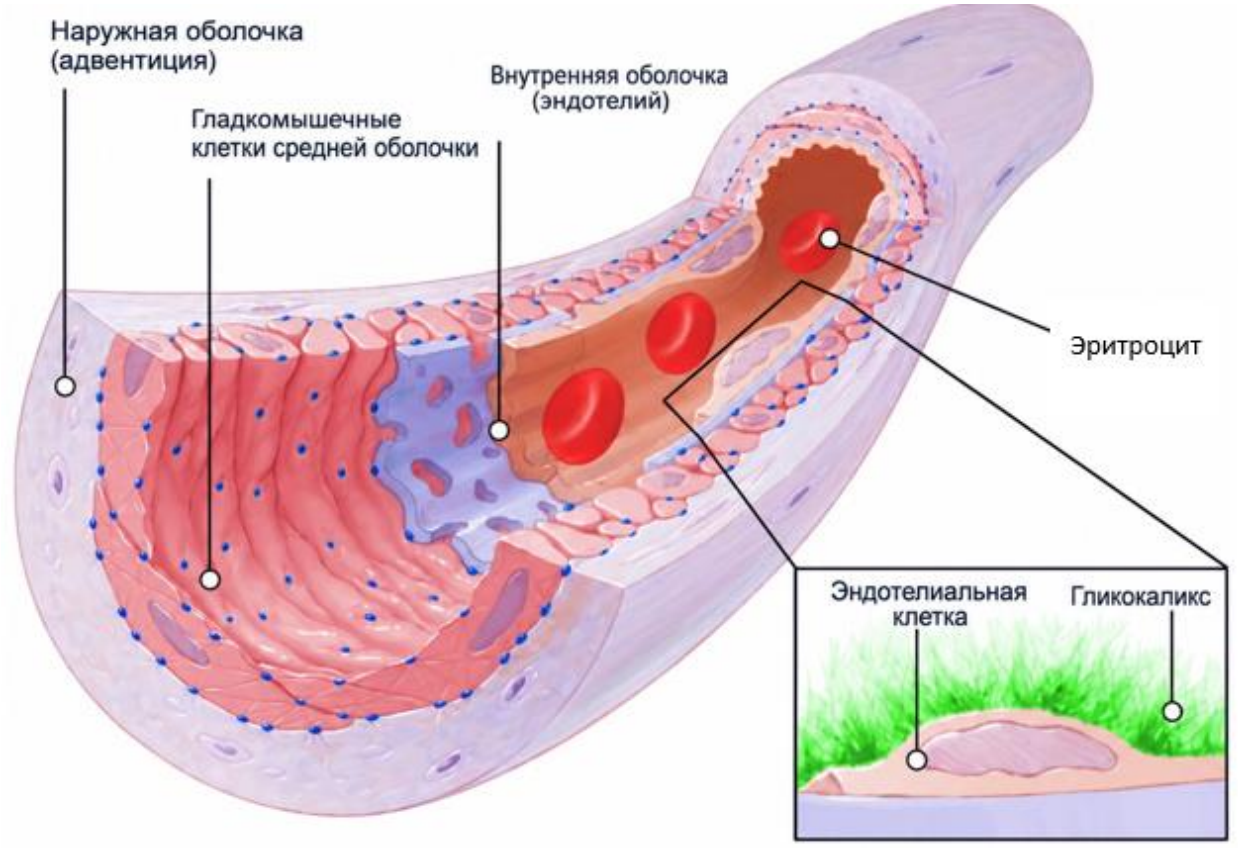


Рисунок 1. Схематическое изображение структурных компонентов мелкой артерии. Сосудистая стенка состоит из трех отдельных слоев: наружной оболочки (адвентиции), средней оболочки (медии) и внутренней оболочки (интимы). Адвентиция состоит из богатой коллагеном соединительной ткани, содержащей фибробласты и периваскулярные нервы. Медиа содержит в основном гладкомышечные клетки сосудов и компоненты внеклеточного матрикса, включая эластические пластинки между слоями гладкой мускулатуры, а также внутреннюю эластическую пластинку, которая отделяет медию от интимы. Интима содержит базальную мембрану и монослой эндотелиальных клеток (эндотелий), который синтезирует и закрепляет все компоненты эндотелиального гликокаликса. Рисунок модифицирован из [184].

Продвигаясь кнаружи от внутренней оболочки, медиа состоит из гладкомышечных клеток сосудов и некоторых компонентов внеклеточного матрикса. В ряде сосудистых русел имеется эластическая пластинка, которая отделяет эндотелиальные клетки от гладкомышечных, при этом допуская наличие миоэндотелиальных контактов через структурные отверстия в пластинке [114,255]. Медиа в первую очередь отвечает за острую регуляцию диаметра артерий. Это достигается за счет сокращения и расслабления гладкомышечных клеток. Совокупность вазодилатирующих и вазоконстрикторных сигнальных компонентов в крови, а также тех, которые генерируются самой гладкой мускулатурой, эндотелием и нервной системой, определяет локальное сократительное состояние гладкомышечных клеток и степень сужения или расслабления сосудов. *Более подобный обзор, посвященный гладким мышцам сосудов, см. [148].* Наконец, адвентиция является самым наружным слоем

сосуда. Она состоит из богатой коллагеном соединительной ткани, содержащей фибробласты и периваскулярные нервы. Ее функция заключается в поддержке роста и восстановления артериальной стенки. Дополнительные данные свидетельствуют о том, что она играет важную роль в иммунном надзоре и миграции воспалительных клеток, а также обеспечивает связь между локальным тканевым окружением и более люминально расположенными гладкомышечными и эндотелиальными клетками [178,179].

Эндотелиальный гликокаликс в значительной степени присутствует на апикальной стороне эндотелия. Его основные компоненты включают гликозилированные белки (гликопротеины) и протеогликаны, то есть гликопротеины с присоединенными цепями гликозаминогликанов (**Рисунок 2**).

Некоторые из этих компонентов гликокаликса прикреплены к клеточной мембране либо через трансмембранные домены, либо посредством ковалентных связей с молекулами, которые ассоциированы с наружным монослоем плазмалеммы. Другие компоненты прикреплены к клетке косвенно через молекулы-рецепторы, такие как интегрины и рецептор гиалуроновой кислоты CD44. Как гликопротеины, так и протеогликаны обеспечивают структурную поддержку гликокаликса. Однако в первую очередь из-за их связи с гликозаминогликанами протеогликаны считаются основными опорными компонентами эндотелиального гликокаликса. В гликокаликсе присутствует множество различных протеогликанов, включая бигликан, декорин, мимекан и перлекан, но двумя наиболее заметными из обнаруженных в эндотелиальном гликокаликсе являются синдеканы и глипиканы.

Синдеканы — это протеогликаны, которые прикрепляются к клетке через трансмембранные домены. Они также имеют цитоплазматические хвосты, которые подвергаются олигомеризации и взаимодействуют с протеинкиназой С. Семейство синдеканов насчитывает четыре члена, а именно: синдекан-1, -2, -3 и -4, из которых синдекан-1 изучен наиболее подробно. Это, вероятно, связано с ролью, которую синдекан-1 играет в модуляции клеточного фенотипа и воспаления. Кроме того, синдекан-1, как и другие синдеканы, способен обеспечивать передачу внеклеточных механических сил на всю клетку посредством своих цитоплазматических якорных связей с белковыми компонентами кортикального цитоскелета, такими как α-актинин, динамин, эзрин, синтенин, синдесмос, тубулин, и, следовательно, на все актиновые стресс-фибриллы внутри клетки [307,329].

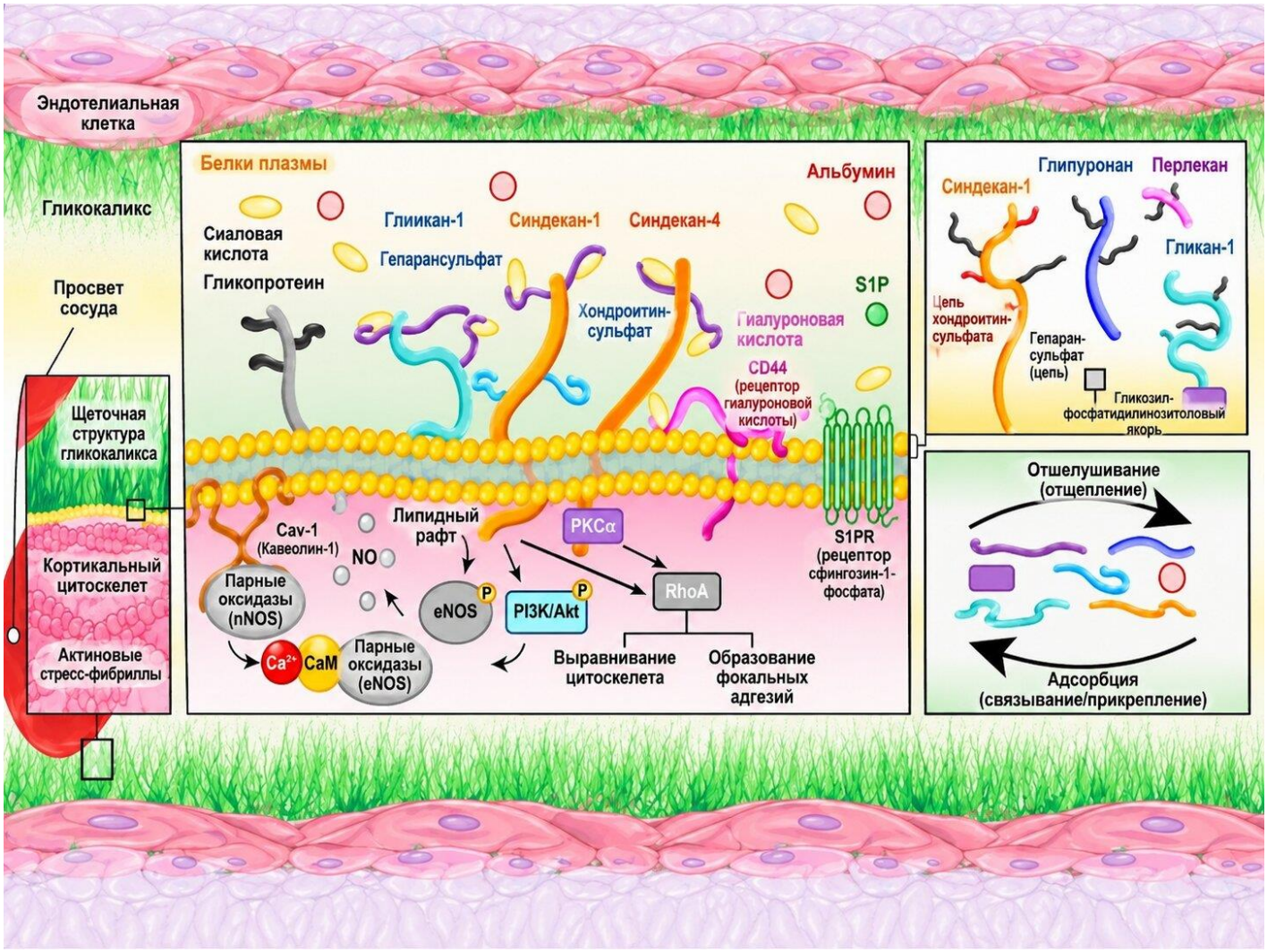


Рисунок 2. Схематическое изображение компонентов эндотелиального гликокаликса. Эндотелиальный гликокаликс отчетливо выражен на апикальной поверхности сосудистого эндотелия. Он имеет щеткоподобную структуру, состоящую из гликопротеинов (например, CD44), некоторые из которых имеют прикрепленные цепи гликозаминогликанов (например, гепарансульфат), которые вместе образуют протеогликановые компоненты (например, синдекан-1). Компоненты гликокаликса могут быть непосредственно прикреплены к клеточной мембране через трансмембранные домены или посредством ковалентных связей с молекулами, которые ассоциируются с эндотелиальной плазмалеммой. Эти якорные взаимодействия включают связи с кавеолином (Cav), протеинкиназой С (PKC) и другими молекулами плазматической мембраны и внутриклеточными молекулами. Они позволяют гликокаликсу участвовать в механотрансдукции физических сил и последующей активации внутриклеточных путей. Такие пути включают образование комплексов кальций-кальмодулин (Ca-Cam), фосфорилирование эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), модуляцию структур цитоскелета и образование эндотелиальных фокальных адгезий. В целом, характеристики сосудистого эндотелия модулируются процессами отщепления (шеддинга) и адсорбции, которые изменяют представленность каждого компонента гликокаликса, присутствующего на поверхности клетки.

По сравнению с семейством протеогликанов синдеканов, глипиканы прикрепляются к клеточной мембране через молекулы гликозилфосфатидилинозитола в наружной плазмалемме [40,86,92,242]. Эти якорные фрагменты сортируются в дискретные мембранные участки, называемые липидными рафтами, которые содержат высокие концентрации кавеол, холестерина, сфинголипидов и других сигнальных молекул [44,75,92,307]. Семейство протеогликанов глипиканов включает шесть членов (глипикан-1 – глипикан-6). Из них глипикан-1 утверждается как изоформа, играющая роль в опосредовании механотрансдукции напряжения сдвига и других сигнальных путей, включая те, которые связаны с каскадами, приводящими к фосфорилированию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и продукции NO [75].

Цепи гликозаминогликанов представляют собой длинные повторы дисахаридных единиц. Они обладают высокой полярностью и обычно имеют множественные паттерны сульфирования, которые модулируют специфические прикрепления белков, а также влияют на электрический заряд и функции гликокаликса. В эндотелиальном гликокаликсе присутствуют различные цепи гликозаминогликанов, а именно: гепарансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат, дерматансульфат и гиалуронан, которые образуют протеогликаны посредством N- или O-связанных гликозилированных прикреплений белка. Из этих гликозаминогликанов гепарансульфат является наиболее распространенным. На него приходится от 50 до 90% всех гликозаминогликанов, прикрепленных к протеогликанам на поверхности сосудистого эндотелия. Это также единственный гликозаминогликан, прикрепленный к трем-четырем сайтам гликозаминогликанов, присутствующим в глипикане-1. Гепарансульфат также связан с синдеканом-1, и, хотя к синдекану-1 прикреплены как гепарансульфатные, так и хондроитинсульфатные гликозаминогликаны, он классифицируется как гепарансульфатный протеогликан, поскольку соотношение гепарансульфата к хондроитинсульфату для синдекана-1 в эндотелиальном гликокаликсе в три-четыре раза выше. Из всех гликозаминогликанов, присутствующих в эндотелиальном гликокаликсе, гиалуронан (или гиалуроновая кислота) является единственным, который не прикреплен ковалентно к протеогликану. Он скорее закреплен на клетке через CD44, его наиболее специфический рецептор клеточной мембраны. В целом, гликозаминогликаны являются преобладающими детерминантами физических и функциональных характеристик эндотелиального гликокаликса. Это является следствием их изобилия, а также высокого уровня взаимодействия друг с другом и с другими компонентами гликокаликса.

Все гликозилированные белки, выступающие из эндотелиальной клетки и прикрепленные к клеточной мембране, можно рассматривать как компоненты гликокаликса. Эти гликопротеины имеют прикрепленные углеводные цепи, которые обычно имеют короткую длину и заканчиваются остатками сиаловой (нейраминовой) кислоты [48]. Ряд гликопротеинов, присутствующих в эндотелиальном гликокаликсе, представляют собой молекулы клеточной адгезии, которые принадлежат к

семействам клеточных рецепторов селектинов, иммуноглобулинов или интегринов. Все эти гликопротеины имеют небольшие цитоплазматические хвосты, трансмембранный домен и вариабельные внеклеточные домены. Их внеклеточные домены особенно важны для обеспечения им специфических функций. Селектины имеют терминальные внеклеточные лектины, которые обеспечивают им характерную способность связывать углеводные группы на других гликопротеинах или гликолипидах. Суперсемейство иммуноглобулинов характеризуется наличием иммуноглобулиноподобных доменов в их внеклеточной структуре. Эти домены участвуют в самораспознавании организма. Наконец, интегрины образуют α- и β-гетеродимеры с внеклеточными доменами, которые служат рецепторами для белков внеклеточного матрикса. Дополнительные молекулы клеточной адгезии, считающиеся частью эндотелиального гликокаликса, включают молекулы межклеточной адгезии (ICAM), молекулу адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток (PCAM/PECAM) и молекулу адгезии сосудистого эндотелия (VCAM), которые являются гликопротеинами с важными функциями, связанными с воспалительными процессами. На люминальной поверхности эндотелия присутствует множество других гликопротеинов, которые участвуют в таких процессах, как гемостаз, коагуляция или фибринолиз, и считаются компонентами эндотелиального гликокаликса.

В дополнение ко всем гликопротеинам, протеогликанам и гликозаминогликанам, которые прямо или косвенно прикреплены к мембране эндотелиальной клетки, существуют растворимые и нерастворимые компоненты, которые связываются с эндотелиальным гликокаликсом и образуют его часть. Среди них — плазменные белки, ферменты, ко-факторы и ингибиторы ферментов, включая, помимо прочего, альбумин, супероксиддисмутазу, ксантиноксидоредуктазу, тромбомодулин и антитромбин III, все из которых участвуют в поддержании гомеостаза гликокаликса [32].

Что касается физических характеристик гликокаликса, сообщения указывают на то, что размер (толщина или длина) гликокаликса сильно варьирует. Он выступает из мембраны эндотелиальной клетки на несколько сотен нанометров — несколько микрометров. Эта разница в размерах гликокаликса связана с его локализацией в сосудистом дереве, а также зависит от метода, используемого для его измерения [187,299]. Как правило, толщина гликокаликса увеличивается вместе с диаметром сосуда в артериальном кровообращении и является наибольшей в легочном кровообращении [259].

МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И МЕХАНОТРАНСДУКЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЛИКОКАЛИКСА

Благодаря тому, что апикальный эндотелиальный гликокаликс выступает в просвет кровеносных сосудов, он идеально расположен для участия в процессах механочувствительности и механотрансдукции напряжения сдвига, генерируемого кровотоком (**Рисунок 3**).

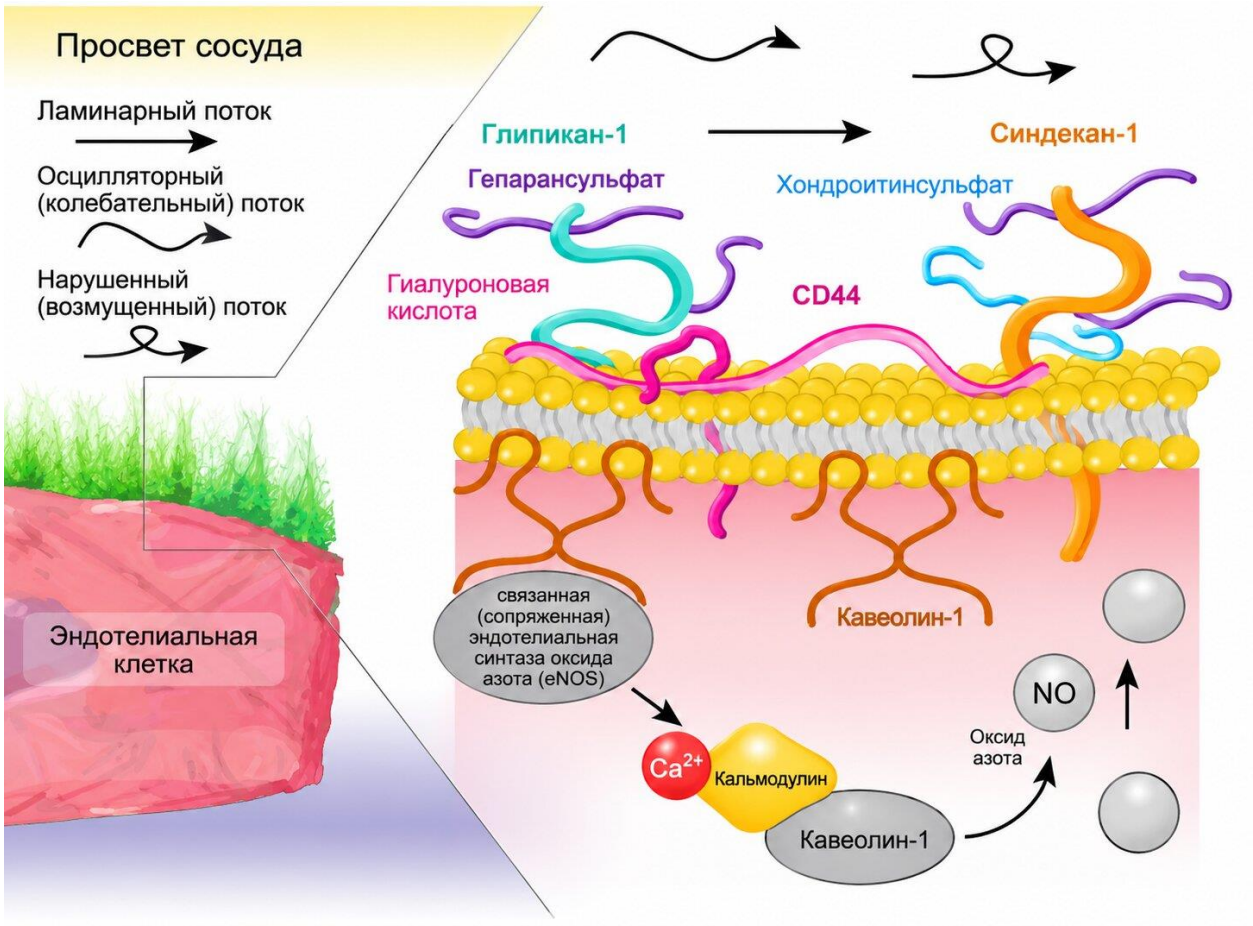


Рисунок 3. Схематическое изображение эндотелиального гликокаликса, подвергающегося воздействию напряжения сдвига, генерируемого кровотоком, и сигнального каскада, который приводит к продукции генерируемого под действием напряжения сдвига оксида азота (NO). Эндотелиальный гликокаликс подвергается воздействию ламинарных, осциллляторных или нарушенных паттернов кровотока, которые деформируют, стимулируют или вызывают отшелушивание (шеддинг) компонентов гликокаликса, что приводит к разнообразным последствиям, включая активацию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), продукцию NO и последующую индукцию вазодилатации.

Другими особенностями гликокаликса, которые делают его хорошо приспособленным для восприятия и передачи сил сдвига, являются его прямые связи с клеточной мембраной и эндотелиальным цитоскелетом. Это дополнительно усиливается присутствием в структуре гликокаликса таких молекул, как интегрины, и их взаимодействием с сигнальными молекулами, такими как ионные каналы, сигналосомы кавеол и киназы, ассоциированные с фокальными адгезиями [7,14,43,203,321]. Главным конечным результатом механочувствительности и механотрансдукции гликокаликса является активация эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), продукция оксида азота (NO) и, в конечном счете, вазодилатация [71]. Однако существуют и другие реакции эндотелия на механотрансдукцию, обусловленную напря-

жением сдвига, которые модулируют структуру эндотелиальных клеток, их реактивность, ремоделирование и, в конечном итоге, состояние сосудистой системы в целом [84].

Доказательства того, что эндотелиальный гликокаликс действует как механосенсор и механотрансдуктор сил сдвига, создаваемых кровотоком, получены в исследованиях, в которых удалялись некоторые его специфические компоненты. Действительно, результаты, демонстрирующие, что такое разрушение снижает или полностью устраняет реакции эндотелия на сдвиг, служат доказательством того, что гликокаликс функционирует как механосенсор или механотрансдуктор. Было показано, что множество других молекул эндотелия, отличных от гликокаликса, включая ионные каналы, рецепторы, сопряженные с G-белком, кавеолы и т. д. [3,123,137,175,189,317], участвуют в восприятии и передаче сил сдвига. Однако механизмы, с помощью которых вся совокупность механочувствительных и механотрансдуцирующих молекул эндотелия взаимодействует, зависит друг от друга или дублирует функции, еще предстоит полностью определить [84].

Основные и связанные с ними компоненты эндотелиального гликокаликса, которые, как было показано, участвуют в механочувствительности и механотрансдукции сил сдвига, включают гепарансульфат, глипикан-1, гиалуронан, сиаловые кислоты и интегрины [88,172,177,226,235]. Конкретный уровень вклада каждого из этих компонентов в механотрансдукцию сдвига в эндотелиальные биохимические сигналы варьируется от исследования к исследованию и может зависеть от конкретных исследуемых эндотелиальных клеток, анализируемого сосудистого русла и степени молекулярного нокдауна компонента гликокаликса. Однако неоспоримо, что для адекватного ответа сосудистого эндотелия на силы сдвига необходимо наличие множества компонентов гликокаликса, если не всей его трехмерной структуры.

С механической точки зрения эндотелий непрерывно подвергается деформациям, вызванным давлением и напряжением сдвига. Давление вызывает сжимающую силу, действующую на всю клетку, тогда как сдвиг представляет собой тангенциальную силу, оказываемую на поверхность клетки трением крови, протекающей рядом с эндотелием. В физиологических условиях эндотелиальные клетки подвергаются воздействию давления в диапазоне от 0 до 210 мм рт. ст. и напряжения сдвига от 1 до 40 дин/см² [84,264]. Эти силы вызывают постоянную корректировку сосудистого тонуса (активного диаметра), что позволяет системе кровообращения быстро обеспечивать адекватный кровоток в тканях. Длительные реакции допускают более стойкие структурные изменения в форме сосудистого ремоделирования [183,276].

Обусловленное кровотоком напряжение сдвига является основным механическим стимулом для опосредованной гликокаликсом механотрансдукции и обычно описывается с использованием представлений о течении Пуазейля с помощью уравнений Навье-Стокса [57]. Однако было показано, что уравнение Бринкмана является лучшей моделью для определения взаимодействия между гликокаликсом и потоком.

В частности, модель Бринкмана позволила показать, что интерстициальные напряжения сдвига, индуцируемые потоком на гликокаликсе, имеют величину, достаточную для обеспечения механотрансдукции, в то время как напряжения, рассчитанные как возникающие на плазматической мембране исключительно за счет сдвигового течения жидкости, таковыми не являются. Это связано с тем, что модель Бринкмана учитывает эффекты как твердых, так и жидких механических напряжений, развиваемых потоком внутри гликокаликса, и то, как они передаются на мембрану клетки, которая встроена во внеклеточный матрикс и закреплена в нем [274]. Таким образом, уравнение Бринкмана позволяет описать взаимодействие между потоком и эндотелием двумя различными, но дополняющими друг друга способами.

В интактной структуре основные компоненты гликокаликса служат рычагами, которые функционируют, чтобы усиливать крутящий момент и впоследствии преобразовывать силы сдвига в деформации на границах раздела гликокаликс–цитоскелет. Этот крутящий момент затем передается в цитоплазму и ядро эндотелиальной клетки, чтобы обеспечить сигнальную механотрансдукцию. С другой стороны, когда гликокаликс поврежден, как это бывает при многих патологических состояниях, механотрансдукция сдвига полагается на прямую деформацию клетки, ее цитоскелета и ее якорных структур базальной мембраны [172].

Ключевая роль гликокаликса в механочувствительности к гемодинамическим изменениям была особенно подтверждена в исследованиях, посвященных опосредованной потоком вазодилатации [226,318]. В экспериментах этих исследований оценивались зависимая от эндотелия продукция NO/вазодилатация в ответ на различные уровни напряжения сдвига в эндотелиальных клетках или изолированных сосудах с интактным гликокаликсом или лишенных его [226,318]. Текущая модель участия интактного гликокаликса в опосредованной потоком вазодилатации предполагает, что прогрессирующее увеличение напряжения сдвига нарушает компоненты гликокаликса, и это совпадает с увеличением натяжения мембраны в липидном бислое эндотелия. Следует отметить, что механизм(ы), связывающие опосредованные сдвигом изменения гликокаликса с повышением натяжения мембраны, четко не установлены. Было продемонстрировано, что модификации как структуры, так и концентрации гликопротеина гликокаликса муцина могут генерировать энтропийные силы изгиба, которые влияют как на натяжение, так и на форму мембраны [153,268]. Предстоит определить, возникают ли аналогичные изменения в межмолекулярных взаимодействиях внутри гликокаликса в ответ на напряжения сдвига, которые впоследствии изменяют натяжение мембраны. Однако ясно, что дополнительные механочувствительные компоненты активируются в сочетании с эффектом напряжения сдвига на гликокаликс и/или натяжение мембраны. Примечательно, что активируются механочувствительные ионные каналы, за которыми следуют внутриклеточные каскады, в конечном итоге увеличивающие активацию eNOS и продукцию NO [71].

Исследования, связывающие гликокаликс с прямой активацией ионных каналов в ответ на напряжения сдвига, ограничены. В микроциркуляторном русле Fancher et al, продемонстрировали, что как длина гликокаликса, так и наличие фрагментов гепарансульфата/гиалуронана являются критическими регуляторами активации входящих выпрямляющих K^+-каналов потоком, и эта активация причастна к индуцированной потоком вазодилатации брыжеечных артерий человека [83]. Эпителиальные Na^+-каналы (ENaC), присутствующие в эндотелии, также реагируют на силу сдвига и играют ключевую роль в регуляции артериального давления. Подобно эффекту отшелушивания гликокаликса на входящие выпрямляющие K^+-каналы, удаление гиалуронана ослабляет индуцированную силой сдвига активность ENaC и снижает ток в эндотелиальных клетках микрососудов легких человека. Механическая активация ENaC частично основана на N-гликозилировании аспарагинов, которые, как считается, действуют как точки прикрепления для внеклеточных тяжей, взаимодействующих с внеклеточным матриксом и/или гликокаликсом [16,137]. Эта гипотеза, названная моделью «привязи» (tethered model), утверждает, что передача механических сил происходит посредством связывания или привязки белков ионных каналов к внутриклеточным структурам цитоскелета и внеклеточным элементам, которые взаимодействуют с внеклеточным матриксом/гликокаликсом [326]. *Более подробный обзор различных механистических моделей механоактивируемых ионных каналов см. [134].*

В совокупности эти исследования указывают на участие гликокаликса в активации как K^+-, так и Na^+-каналов. Механизм, лежащий в основе этой активации, подвержены ли другие ионные каналы аналогичному влиянию индуцированных сдвигом изменений гликокаликса, и как активация ионных каналов в конечном итоге приводит к продукции NO, еще предстоит определить. *Более подробный обзор ионных каналов, участвующих в реакциях эндотелиальных клеток на напряжение сдвига и последующей активации eNOS, см. [98].* Что касается внутриклеточных компонентов этого пути, дополнительные модели предполагают, что напряжение сдвига индуцирует высвобождение ацетилхолина из эндотелиальных клеток. Активация мускариновых рецепторов ацетилхолином, в свою очередь, способствует высвобождению кальция из внутриклеточных депо, что активирует eNOS [314]. В клетках или кровеносных сосудах, лишенных гликокаликса, индуцированная сдвигом продукция NO в основном отсутствует, но имеется относительно незначительный вклад в опосредованные потоком реакции со стороны путей, таких как связанные с продукцией простациклина [226]. Эти данные ясно указывают на то, что гликокаликс является важным компонентом индуцированной сдвигом механочувствительности и механотрансдукции в эндотелиальных клетках.

В дополнение к исследованиям, в которых опосредованная потоком вазодилатация использовалась в качестве основного результата индуцированной сдвигом механотрансдукции, существуют дополнительные подтверждающие доказательства

роли эндотелиального гликокаликса как механосенсора, полученные в экспериментах с механической деформацией клеток в условиях отсутствия потока. Например, в исследованиях с использованием атомно-силовой микроскопии сообщалось о повышенной продукции NO в изолированных эндотелиальных клетках или эксплантатах артерий в ответ на натяжение гликокаликса (глипикана-1 или гепарансульфата) с помощью функционализированных кантилеверов (*зонды (микробалки) атомно-силового микроскопа, на кончик которых нанесены специфические молекулы или химические группы*). Примечательно, что натяжение глипикана-1 индуцировало примерно на 50% большую продукцию NO, чем натяжение гепарансульфата [18,75]. Это позволяет предположить, что путь гликокаликс (глипикан, гепарансульфат) – кавеолы – eNOS играет важную роль в реакции механочувствительности и механотрансдукции на физическую деформацию в эндотелиальных клетках [57]. Также было показано, что различные структурные и механические характеристики гликокаликса (например, его длина и жесткость) играют роль в зависимой от гликокаликса механотрансдукции. В поддержку этого, уменьшение длины гликокаликса положительно коррелировало со снижением функции эндотелия, включая активацию eNOS и продукцию NO [275]. Что касается жесткости гликокаликса, предполагается, что чрезмерно мягкий гликокаликс не сможет воспринимать небольшие механические возмущения. В сравнении с этим, чрезвычайно жесткий гликокаликс может быть слишком чувствительным к силовым возмущениям, что, вероятно, нарушит нижележащий цитоскелет [217]. Тем не менее, полное понимание того, как все сложные механические и структурные характеристики эндотелиального гликокаликса в различных участках сосудистого русла влияют на опосредованную сдвигом механотрансдукцию, еще предстоит полностью определить.

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ГЛИКОКАЛИКС И СОСУДИСТАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ

Физическая архитектура сосудистого русла функционирует как проводник для доставки оксигенированной крови с целью удовлетворения метаболических потребностей тканей организма. Неотъемлемой чертой ее строения является то, что здоровое сосудистое русло непрерывно и пассивно пропускает мелкие молекулы/растворенные вещества в окружающие ткани. В отличие от них, более крупные молекулы (>70 кДа) при непатологических состояниях не имеют возможности пассивно покидать сосудистое русло. Двумя основными физическими параметрами, регулирующими пассивную экстравазацию молекул из сосудистого русла, являются размер и электростатический заряд. Размерный барьер преимущественно зависит от наличия или отсутствия адгезионных [60] и плотных контактов [117] в местах соприкосновения соседних эндотелиальных клеток (парацеллюлярно), выстилающих просвет сосудистого русла. Дополнительными факторами, способствующими формированию специфического фильтрационного размера барьера, являются состав внеклеточного

матрикса базальных мембран, включая гликокаликс, а также наличие или отсутствие эндотелиальных фенестр и фенестральных диафрагм [224]. Считается, что макроциркуляторное русло обладает ограниченной проницаемостью, отчасти из-за своего непрерывного эндотелия. Напротив, эндотелий микроциркуляторного русла может быть, как непрерывным, так и прерывистым, с фенестрами или без них, в зависимости от сосудистого русла. Наличие фенестр облегчает обмен мелкими молекулами/растворенными веществами [245], поэтому непрерывный фенестрированный эндотелий проявляет большую проницаемость, чем эндотелий без фенестр [2]. В дополнение к физической архитектуре сосудистого русла, определенные клетки (например, перициты [9], тучные клетки [143,156] и другие иммунные клетки [68]) могут дополнительно модулировать размерный барьер и влиять на проницаемость.

Наше понимание движения жидкости через сосудистое русло развивалось с тех пор, как более 100 лет назад, в 1896 году, впервые был предложен принцип Старлинга, описывающий трансваскулярную динамику жидкости. Согласно этой гипотезе, именно баланс суммы давлений, выталкивающих жидкость из сосуда, и противоположных сил, выталкивающих жидкость в сосуд, определяет результирующее движение жидкости. Старлинг предположил, что силами, выталкивающими жидкость из сосуда, являются гидростатическое давление в просвете и онкотическое давление тканей, а силами, противодействующими этому движению, — онкотическое давление в просвете и гидростатическое давление тканей. В этой модели результирующие силы на артериолярной стороне капиллярного русла выталкивают жидкость наружу, а на венозной стороне, по мере уменьшения этих сил, жидкость возвращается обратно в сосудистое русло. Последующие эксперименты продемонстрировали недостатки гипотезы Старлинга. Обзор этих недостатков подробно описан Alphonsusy et al. [6], которые, кратко говоря, утверждают, что устойчивая венозная реабсорбция происходит не во всех тканях. Хотя Старлинг мог измерять капиллярное гидростатическое и онкотическое давление, он не мог точно определить интерстициальное давление. Последующие оценки показали, что гидростатическое и онкотическое давление в тканях значительно ниже внутрикапиллярного давления. Например, Bates et al. продемонстрировали, что в плече человека результирующее давление, противодействующее экстравазации, меньше венозного давления в локтевой ямке [19].

Вторая критика заключается в том, что скорость капиллярной фильтрации/экстравазации намного ниже, чем предсказывает уравнение Старлинга. Это следует из наблюдения, что лимфатическая система является единственной альтернативой реабсорбции для возврата жидкости в кровообращение, наряду с оценкой того, что лимфатический поток значительно меньше капиллярной экстравазации, предсказываемой уравнением Старлинга.

Третья критика заключается в том, что капиллярная реабсорбция также намного ниже, чем предсказывается уравнением Старлинга. Примечательно, что пересмотренное уравнение Старлинга, учитывающее гликокаликс, ограничивающий экстравазацию/фильтрацию, разрешает эти загадки. Изображение этого пересмотренного уравнения Старлинга, представленное Levick et al показано на **Рисунке 4.**

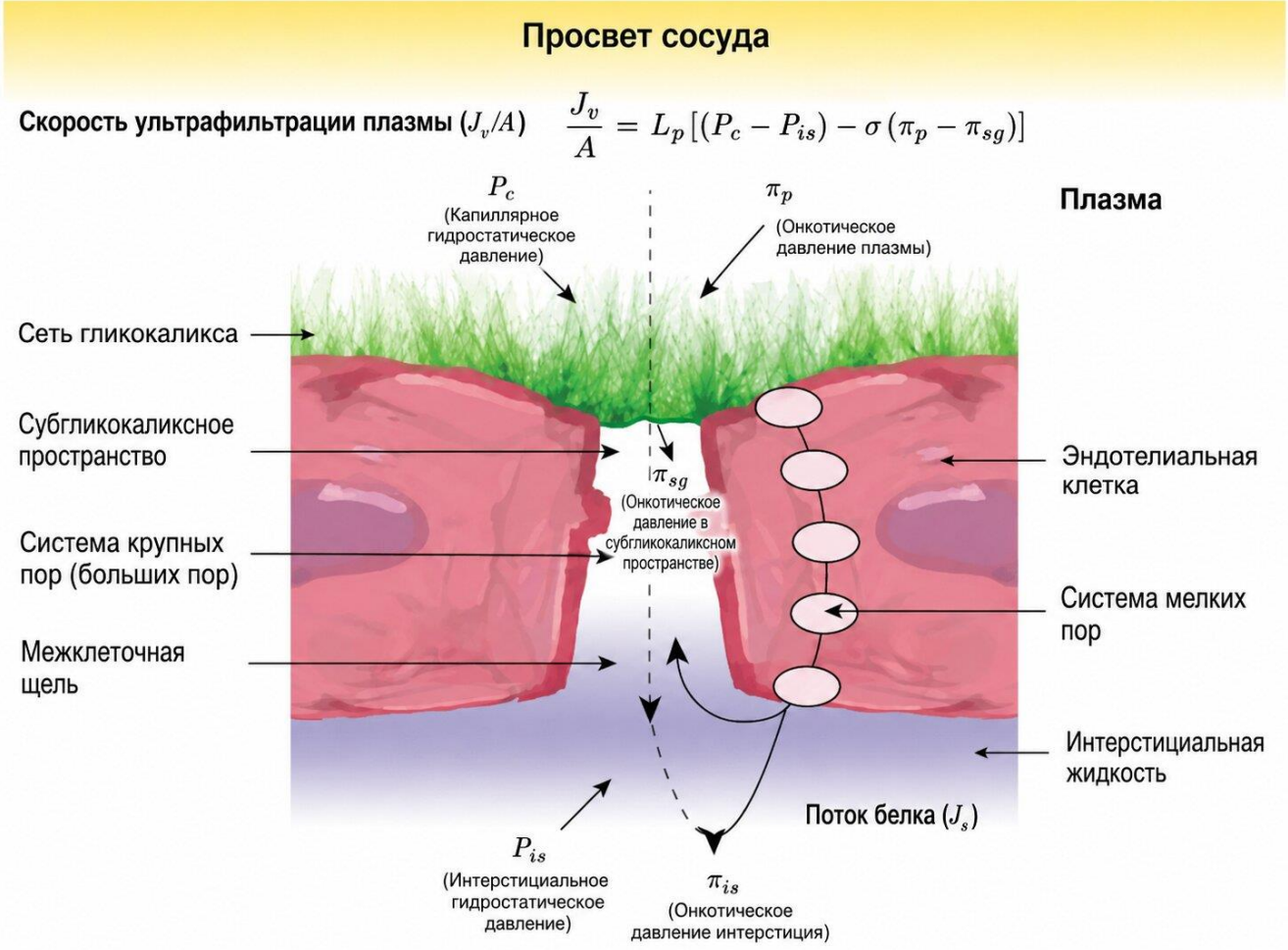


Рисунок 4. Иллюстрация сил, определяющих сосудистую проницаемость, и их взаимосвязь с эндотелиальным гликокаликсом. В непатологических условиях интактный эндотелиальный гликокаликс играет существенную роль в процессе сосудистой проницаемости, выступая в качестве физического и электростатического барьера. Хотя фильтрация молекул в основном зависит от адгезионных контактов между клетками и парацеллюлярных плотных контактов, отрицательно заряженная кустовидная структура гликокаликса предотвращает экстравазацию макромолекул размером более примерно 70 кДа, а также катионных молекул.

Jv/A — фильтруемый объем на единицу площади; **Lp** — гидравлическая проводимость; **Pc** — капиллярное гидростатическое давление; **Pis** — интерстициальное гидростатическое давление; **σ** — коэффициент осмотического отражения; **πp** — онкотическое давление на плазменной стороне слоя эндотелиальной поверхности; **πsg** — онкотическое давление в субгликокаликсном пространстве [159].

В поддержку этой пересмотренной версии принципа Старлинга эксперименты, изучающие барьерную функцию гликокаликса млекопитающих, показывают, что он исключает макромолекулы размером более примерно 70 кДа. Например, в мезентериальных артериях мышей флуоресцентные зонды размером 148 кДа исключаются из гликокаликса, тогда как зонды размером 50,7 кДа способны проникать через гликокаликс примерно за 30 минут [291]. В препаратах кремастерной мышцы хомяка лейкоциты, которые легко проходят через гликокаликс, могут занимать всю анатомическую ширину кремастерных капилляров. В отличие от них, эритроциты, а также флуоресцентный зонд размером 70 кДа занимают значительно меньшую ширину столба в капилляре, что указывает на их исключение из гликокаликса [299].

Помимо исключения по размеру, существует также электростатический барьер, препятствующий выходу заряженных молекул из сосудистого русла. Здесь гликокаликс, будучи отрицательно заряженным гелем, играет центральную роль в регуляции сосудистой проницаемости. Как упоминалось ранее, существует пять классов гликозаминогликанов, составляющих гликокаликс, и они сильно сульфированы, что приводит к общему отрицательному заряду. Этот отрицательно заряженный барьер гликокаликса препятствует выходу катионных молекул из сосудистого русла. Необходимо упомянуть, что, хотя гликокаликс частично состоит из анионных олигосахаридов, его отрицательный заряд, обусловленный сульфированными гликозаминогликанами, преобладает и играет центральную роль в регуляции сосудистой проницаемости. Например, гепарансульфат, на долю которого приходится 50–90% всех гликозаминогликанов, присутствующих в эндотелиальном гликокаликсе, является сульфированным гликозаминогликаном. Другими сульфированными гликозаминогликанами, присутствующими в гликокаликсе, являются хондроитинсульфат, дерматансульфат и кератансульфат. Следовательно, сульфирование гликозаминогликанов вносит основной вклад в общий отрицательный заряд гликокаликса, а также обеспечивает каркас для связывания с другими белками как из циркуляции, так и статически встроенными во внеклеточный матрикс. Например, гиалуронан не прикреплен ковалентно к протеогликанам. Вместо этого он нековалентно взаимодействует со структурами гликокаликса через мотивы связывания гиалуронана [79]. Карбоксильные группы его остатков глюкуроновой кислоты отрицательно заряжены при физиологическом pH, и, таким образом, присутствие гиалуронана в гликокаликсе дополнительно способствует его анионной природе [294].

Дополнительной характеристикой гликокаликса, влияющей на его заряд, является наличие сиаловых кислот. Сиаловые кислоты представляют собой ацилированные производные девятиуглеродного сахара нейраминовой кислоты и обычно являются концевыми сахарами гликановых цепей, прикрепленных к гликолипидам и

гликопротеинам. У людей преобладающими сиаловыми кислотами являются N-ацетилнейраминовая кислота **(Рисунок 5**) и ее гидроксилированное производное Neu5Gc, последнее из которых происходит исключительно из пищевых источников [253].

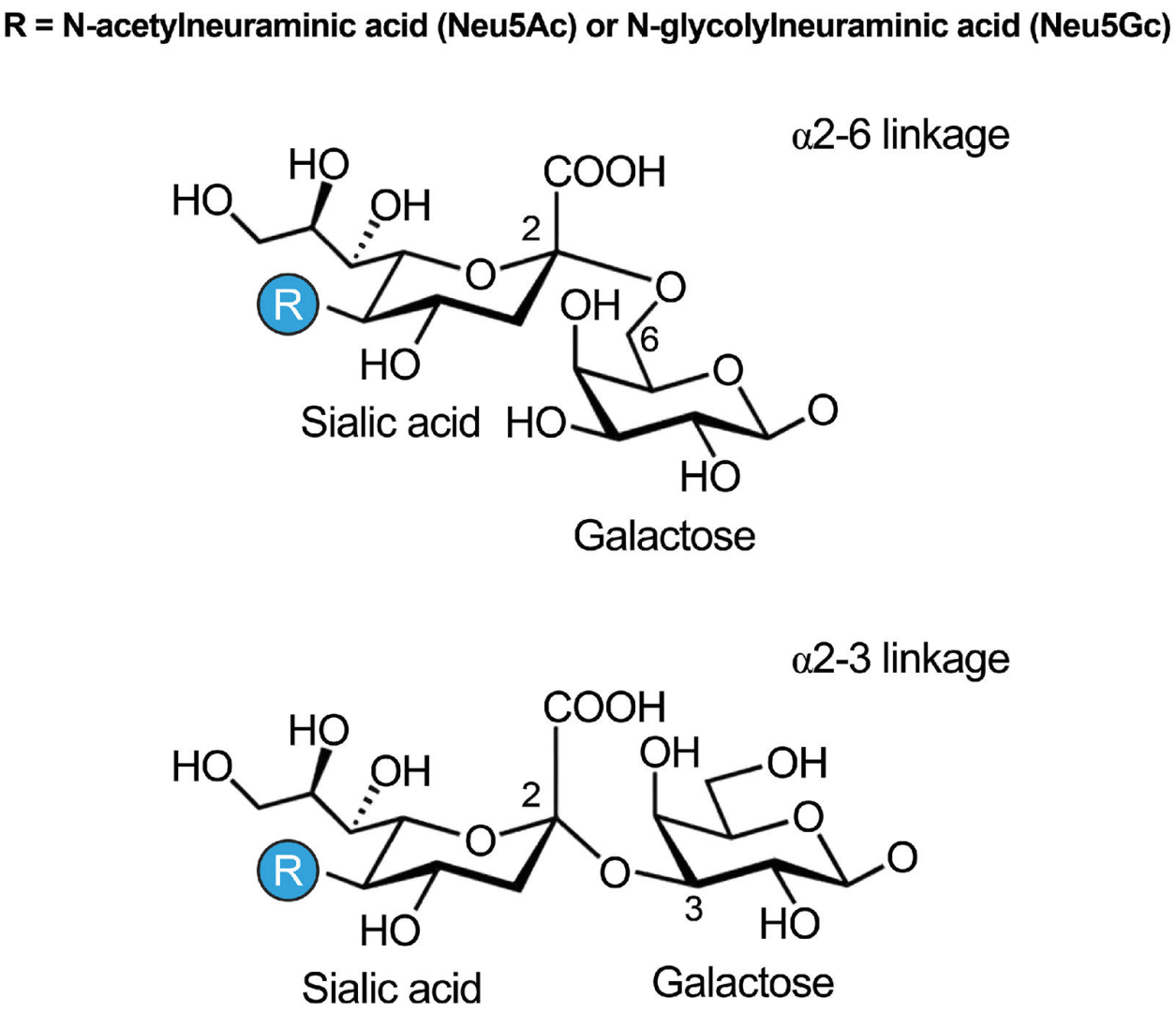


Рисунок 5. Двумя основными остатками сиаловых кислот, присутствующими в эндотелиальном гликокаликсе, являются N-ацетилнейраминовая кислота и N-гликолилнейраминовая кислота, которые различаются по типу связи с углеводными фрагментами, входящими в состав гликопротеиновых компонентов гликокаликса.

Сиаловые кислоты являются подмножеством нонулосоновых кислот, и все нонулосоновые кислоты несут отрицательно заряженный карбоксилат (C-1) и трехуглеродную экзоциклическую боковую цепь (C-7 – C-9). Ранние исследования эритроцитов показали, что сиаловые кислоты придают анионные свойства содержащим их молекулам. Следовательно, эритроциты многих видов животных демонстрируют отрицательную электрофоретическую подвижность, что указывает на суммарный

отрицательный заряд. Это анионное свойство в первую очередь обусловлено карбоксильной группой сиаловых кислот, присутствующих на их поверхности. Действительно, было обнаружено, что удаление сиаловых кислот ферментом нейраминидазой снижает электрофоретическую подвижность эритроцитов пропорционально количеству удаленных сиаловых кислот [80]. Последующие исследования гликокаликса продемонстрировали, что присутствие сиаловых кислот в эндотелиальном гликокаликсе аналогичным образом способствует его полианионной природе. Поэтому, в соответствии с ролью сиаловых кислот как факторов, определяющих электростатический статус, их удаление с помощью нейраминидазы значительно снижает отрицательный заряд гликокаликса [136]. Действительно, при патологиях, связанных с повышенной активностью нейраминидазы плазмы и сниженным содержанием сиаловых кислот, также наблюдается снижение отрицательного поверхностного заряда сосудистого эндотелия [209].

К сожалению, систематических исследований для оценки поверхностного заряда гликокаликса не проводилось. Более того, представляется разумным предположить, что локальный отрицательный заряд гликокаликса также варьируется по всему сосудистому руслу в зависимости от целостности, прочности и состава гликокаликса в конкретных местах. Фактором, способствующим этой вариации, является то, что синтез компонентов гликокаликса происходит не только в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, но и в ряде других клеточных локаций. Кроме того, их синтез зависит от перекрывающихся взаимозависимых биохимических путей, которые реагируют на метаболическое состояние клетки и подвержены его влиянию [152]. Например, изоформы гиалуронансинтазы действуют на плазматической мембране, собирая гиалуроновую кислоту [197], и активируются путем фосфорилирования [296], убиквитинирования [130] или O-GlcNAc-гликозилирования [297], а также дополнительно регулируются образованием межмолекулярных дисульфидных связей [99]. Поэтому разумно предположить, что существует высокая степень гетерогенности как в составе, так и в электростатическом статусе и концентрации компонентов гликокаликса в пределах системы кровообращения.

Отрицательный заряд гликокаликса также влияет на связывающие характеристики белков, взаимодействующих с его различными компонентами. Эти партнеры по связыванию обеспечивают сложную систему коммуникации между эндотелиальными клетками и локальной химической средой. Более того, они способны существенно влиять на сосудистую проницаемость и внутриклеточную сигнализацию. В целом, электростатический заряд гликокаликса функционирует как барьер, отталкивающий отрицательно заряженные молекулы, макромолекулы и клетки, включая эритроциты и активированные тромбоциты. Однако именно совокупные функции барьера по размеру и заряду гликокаликса предотвращают экстравазацию молекул размером более примерно 70 кДа, а также влияют на способность молекул с разными зарядами и размерами связываться с компонентами гликокаликса. Для поддержания

тканевого гомеостаза более крупным молекулам необходимо преодолевать эндотелиальный барьер. Таким образом, гликокаликс облегчает транспорт клеток, белков и питательных веществ через эндотелиальный барьер посредством строго регулируемых процессов. Например, экстравазация иммунных клеток представляет собой рецептор-опосредованный процесс, который подавляется здоровым гликокаликсом. В ответ на локальное воспаление хемокины опосредуют деградацию гликокаликса, обнажая рецепторы для связывания с молекулами адгезии, такими как E-селектин на лейкоцитах, что позволяет иммунным клеткам связываться с эндотелием и инфильтрировать подлежащую ткань [241].

В совокупности данные исследований, изучающих структуру гликокаликса и измеряющих сосудистую проницаемость, позволяют предположить, что наличие или отсутствие конкретных компонентов гликокаликса влияет на эндотелиальную проницаемость независимо от длины гликокаликса. В целом, однако, более тонкий гликокаликс обычно связан с повышенной проницаемостью.

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ГЛИКОКАЛИКС И ИММУНОЛОГИЯ

Помимо формирования фильтрующего сита для регуляции сосудистой проницаемости, гликокаликс играет центральную роль в защите сердечно-сосудистой системы и тканей, орошаемых кровью, от патогенов и аутологичных повреждающих компонентов. Гликокаликс, а вместе с ним и эндотелиальные клетки, к которым он прикреплен, подвергаются воздействию любых патогенов, попадающих в кровоток. Как уже упоминалось, гликокаликс образует гелеподобную отрицательно заряженную структуру, которая электростатически препятствует инфильтрации эритроцитов (**Рисунок 6**). Это происходит потому, что поверхность эритроцитов несет отрицательный заряд из-за ионизации карбоксильной группы N-ацетилнейраминовой кислоты [80,233,248].

В непатологических условиях столб эритроцитов, протекающий через сосудистое русло, физически не контактирует с эндотелием. Действительно, эритроциты текут вдоль эндотелиальных клеток, отделенные друг от друга физической шириной отрицательно заряженных гликановых структур (гликозаминогликанов и сиаловой кислоты), составляющих гликокаликс. Это расстояние, за вычетом небольшого пространства, в которое эритроциты способны проникать в гликокаликс, называется перфузируемым пограничным регионом (PBR), как показано на **Рисунке 7** [56,69,299]. Этот PBR представляет собой прижизненную (*in vivo*) длину или толщину эндотелиального гликокаликса, который отделяет эндотелиальные клетки от протекающей крови. Используя визуализацию в темном поле с боковым освещением, Leey et al. продемонстрировали, что у здоровых субъектов эритроциты сохраняют фиксированное расстояние от эндотелия капилляров [155].

В условиях, когда гликокаликс поврежден или укорочен, перфузируемый пограничный регион становится тоньше, позволяя эритроцитам протекать ближе к эндотелию. Это приводит к увеличению объема крови в капиллярах и артериолах. Гематокрит в капиллярной трубке — это отношение объема упакованных эритроцитов к общему объему крови. В условиях, когда гликокаликс деградирован, уменьшение толщины гликокаликса приводит к увеличению капиллярного гематокрита [46] и уменьшает расстояние между потоком эритроцитов и мембраной эндотелиальных клеток [155].

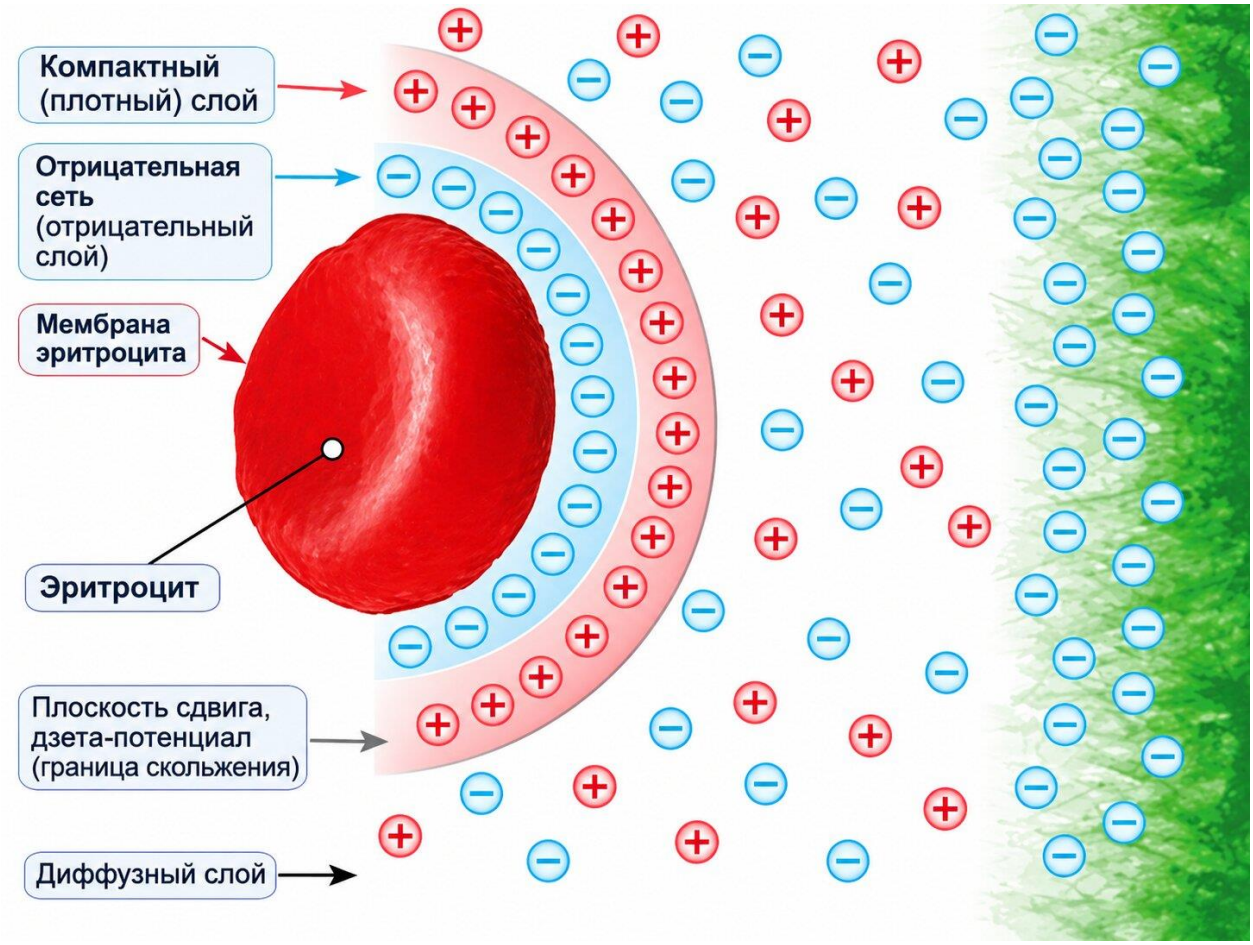


Рисунок 6. Эндотелиальный гликокаликс имеет отрицательный заряд. Это обеспечивает формирование диффузного электростатического барьера, который отделяет эндотелий от других отрицательно заряженных компонентов крови, таких как эритроциты.
Справа на схеме изображена зеленая структура эндотелиального гликокаликса с отрицательными зарядами, которая электростатически отталкивает отрицательно заряженный эритроцит.

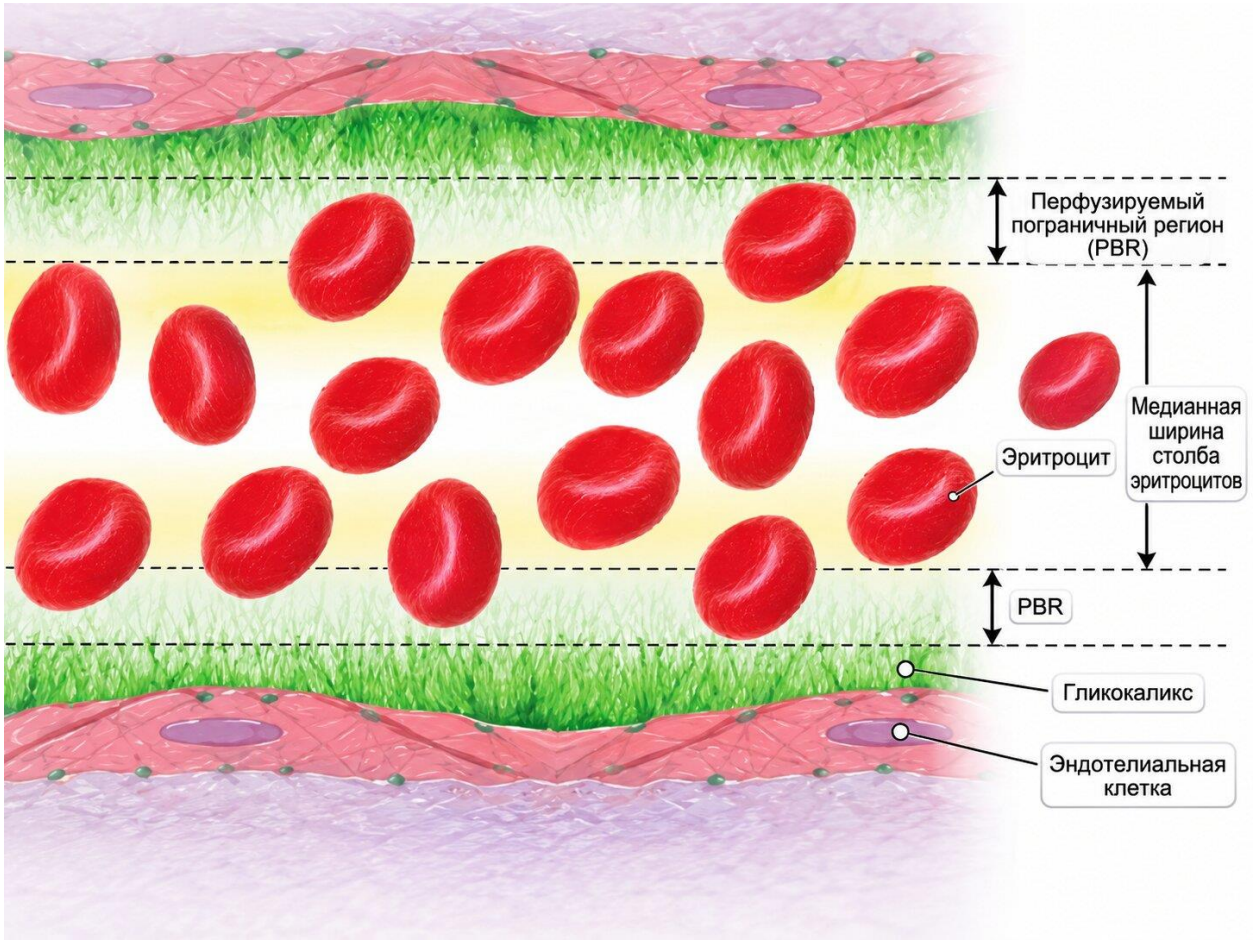


Рисунок 7. Схематическое изображение перфузируемого пограничного региона (PBR), который позволяет оценить толщину эндотелиального гликокаликса *in vivo.* Протекающие эритроциты образуют столб, продвигаясь по просвету сосуда. Скорость кровотока и электростатические заряды как эндотелиального гликокаликса, так и эритроцитов формируют PBR, в который лишь немногие эритроциты проникают эпизодически. Размер медианной ширины столба эритроцитов, вычтенный из диаметра просвета сосуда, представляет собой меру PBR и толщины эндотелиального гликокаликса. Рисунок модифицирован из [56].

Аналогичным образом, одной из первых линий защиты от вторжения патогенов является физическое расстояние, отделяющее столб эритроцитов (и все, что в него проникло) от апикальной мембраны эндотелиальных клеток. Например, бактерии, попадающие в кровоток, используют систему кровообращения в качестве проводника для перемещения по организму, и чтобы успешно колонизировать/инфицировать подлежащую ткань, они должны взаимодействовать с эндотелием и проникать через него. Подобно эритроцитам, большинство бактерий также окружены отрицательно заряженной структурой гликокаликса, характеристики которой варьируются от штамма к штамму [315]. Это приводит к тому, что электростатические заряды бактерий и эндотелия отталкиваются, препятствуя доступу патогена к поверхности эндотелиальных клеток. Действительно, большинство бактерий имеют отрицательно заряженные стенки. Как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии

имеют клеточную стенку, состоящую из дисахаридного пептидогликана, расположенного снаружи от клеточной мембраны. Два производных глюкозы: N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота составляют основу этой молекулы дисахаридного пептидогликана. Грамотрицательные бактерии обладают дополнительной эндотоксиновой мембраной из липополисахаридов, расположенной дистальнее клеточной стенки, которая содержит отрицательно заряженные головные группы и анионную липидную липотейхоевую кислоту [260]. Грамположительные бактерии не имеют этой структуры, но обладают анионными липидами [180]. Кроме того, грамположительные бактерии обычно имеют гораздо больше слоев пептидогликанов и фосфатсодержащей анионной тейхоевой кислоты, которые способствуют формированию общего суммарного отрицательного поверхностного заряда [315]. Таким образом, структура как бактериального, так и эндотелиального гликокаликса обеспечивает защиту за счет физического расстояния, а также защиту от адгезии. Это было подтверждено в исследованиях, демонстрирующих, что наибольшая степень бактериальной адгезии происходит на субстратах, которые имеют положительный заряд и гидрофильны, тогда как отрицательно заряженные субстраты наименее подвержены адгезии [219].

Что касается вирусов, их поверхностный заряд также в основном отрицательный при физиологическом pH 7,4. Это наблюдение получено из обзора опубликованных изоэлектрических точек (значение pH, при котором суммарный заряд равен нулю), который показал диапазон значений от 1,9 до 8,4, причем наибольшая частота встречаемости приходится на диапазон 3,5–7 [190]. Таким образом, подобно бактериям, для большинства вирусов (то есть тех, которые имеют изоэлектрическую точку ниже 7,4) существует электростатический барьер, препятствующий адсорбции на эндотелиальном гликокаликсе. Действительно, исследования на матрицах диоксида кремния показали, что адсорбция вирусов на отрицательных поверхностях происходит только в растворах с pH ниже изоэлектрической точки [331].

Можно предположить, что важность структурной целостности гликокаликса в предотвращении инфекции патогенами лучше всего подчеркивается множеством микробных механизмов, которые пытаются обойти эту структурную защиту. Например, попав в кровоток, вирус денге инфицирует клетки-мишени, такие как моноциты/макрофаги, и запускает секрецию белка, который активирует эндотелиальные сиалидазы, катепсин L и гепараназу, которые впоследствии разрушают эндотелиальный гликокаликс [20,237]. Аналогичные механизмы, включающие нарушение целостности эндотелиального гликокаликса, были приняты на вооружение другими агентами, включая пищевые патогены, такие как *Salmonella* [8] и *Listeria* [247], воздушно-капельные патогены, такие как *бета-коронавирус SARS-CoV-2*, вызывающий COVID-19 [279], а также гематогенные патогены, такие как малярийный паразит *Plasmodium falciparum* [112].

Помимо центральной роли электрического заряда в защите от адгезии и инвазии патогенов, другие характеристики и компоненты эндотелиального гликокаликса также участвуют в иммунологических функциях. Например, сиаловые кислоты — концевые фрагменты на разветвленных протеогликанах и ганглиозидах, составляющих гликокаликс, — вовлечены в разнообразный спектр иммунологических функций. Эти функции включают их роль в качестве антигенов в иммунных реакциях и точек контакта для гликан-связывающих белков, которые опосредуют как межклеточные взаимодействия, так и взаимодействия клеток с патогенами. Сиаловые кислоты также опосредуют межклеточную адгезию между иммунными клетками и сосудистым эндотелием, отчасти посредством регуляции связывания с селектинами. Они дополнительно модулируют функцию других важных эндотелиальных белков, участвующих в иммунных реакциях, включая молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), молекулу адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток-1 (PECAM-1), рецептор фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR-2) и рецептор гиалуронана эндотелия лимфатических сосудов-1 (LYVE-1) [51]. Дополнительной функцией сиаловых кислот в иммунной системе является помощь в дифференциации нативных клеток-хозяев от чужеродных патогенов. Это достигается, отчасти, путем их вмешательства в каскад комплемента, чтобы предотвратить нацеливание иммунной системы на нативные клетки [27,258]. Другими примерами компонентов гликокаликса, опосредующих иммунные реакции, являются роль олигосахаридов гепарансульфата в регуляции адгезии, миграции и активации иммунных клеток, отчасти за счет ингибирования протеаз лектинового пути активации комплемента [273]. Также было показано, что гепарансульфат связывается с цитокинами и факторами роста и модулирует их, а также устанавливает химические градиенты для морфогенов, факторов роста и цитокинов [256]. Более того, он может функционировать как ко-рецептор для стабилизации событий связывания рецептора/лиганда, а также для опосредования путей передачи сигнала иммунного ответа [230]. Еще одни компоненты гликокаликса, а именно гиалуроновая кислота и ее фрагменты, являются хорошо задокументированными молекулами, участвующими в патологических состояниях [41]. Было показано, что низкомолекулярные фрагменты гиалуронана индуцируют воспалительные реакции в макрофагах и стимулируют ангиогенез [115,216]. Напротив, высокомолекулярные фрагменты оказывают противоположное действие на ангиогенез [309]. Более того, рецептор гиалуронана CD44 при связывании с E-селектином облегчает процесс роллинга и адгезии лейкоцитов к эндотелию [59,186]. В целом, все эти примеры подчеркивают множество механизмов, посредством которых различные компоненты и характеристики эндотелиального гликокаликса участвуют в иммунных реакциях и защите хозяина.

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ГЛИКОКАЛИКС И СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Сфингозин-1-фосфат

Тесная взаимосвязь, существующая между структурами гликокаликса и клеточной мембраной, предоставляет множество путей, посредством которых мембраносвязанные сигнальные молекулы модулируются гликокаликсом, и наоборот. Например, было показано, что биоактивные сфинголипиды участвуют в мембранной передаче сигнала и в различных клеточных процессах [17]. Среди них сфингозин-1-фосфат (S1P) является примечательным, поскольку он может модулировать несколько биологических функций, таких как сокращение клеток, выживание, пролиферация и миграция [234]. S1P — это сфинголипид, полученный из сфингозина, который является продуктом гидролиза церамида, генерируемым в процессе, берущем начало из деградации гликосфинголипидов и сфингомиелина плазматической мембраны [234]. После образования сфингозин может быть обратно преобразован в церамид с помощью церамидсинтазы или далее расщеплен до S1P в реакции, регулируемой двумя сфингозинкиназами (SPHK1 и SPHK2) [234]. После своего образования S1P может быть возвращен в церамид посредством дефосфорилирования S1P, далее расщеплен на гексадеценаль и фосфоэтаноламин, либо высвобожден во внеклеточную среду [234]. Хотя тромбоциты и эндотелиальные клетки могут производить S1P [295], эритроциты являются основным источником S1P, внося около 70% от 0,3–0,5 мкМ S1P, обнаруживаемого в плазме человека [28,220]. S1P может передаваться от эритроцитов к эндотелиальным клеткам путем прямого контакта или через транспорт липопротеинами высокой плотности (ЛПВП) и альбумином [283,327]. Фактически, большая часть S1P связана с этими белками-носителями, причем на ЛПВП приходится около 60%, а на альбумин — 30% циркулирующего S1P [28]. Связывание S1P с ЛПВП или альбумином предотвращает его деградацию циркулирующими сфингозинфосфатазами, тем самым позволяя S1P связываться со своими рецепторами на клеточной мембране целевой ткани [146]. На сегодняшний день идентифицировано пять рецепторов S1P (S1PR) (S1PR-1-5), причем S1PR-1, -2 и -3 экспрессируются в большинстве органов и тканей, включая сосудистый эндотелий [170]. Сосудистое действие S1P может варьироваться в зависимости от рецепторов, с которыми он связывается, при этом активация S1PR-1 и -3 связана со стабильностью кровеносных сосудов и гомеостазом гликокаликса [170,305].

Как упоминалось ранее, эндотелиальный гликокаликс постоянно подвергается воздействию условий, вызывающих его деградацию и отшелушивание, таких как нарушенный кровоток, воспаление, гипергликемия, травма и удаление белков крови [30,167,213,239]. Это требует непрерывного восстановления гликокаликса для поддержания его функциональности. В связи с этим было показано, что S1P играет решающую роль в поддержании гомеостаза кровеносных сосудов и гликокаликса путем индукции высвобождения NO и предотвращения отшелушивания синдекана-1 [39,327]. Предыдущие данные свидетельствуют о том, что активация S1PR ингибирует активность матриксных металлопротеиназ (ММП), в частности ММП-9 и

ММП-13 [327]. В активном состоянии эти ММП могут расщеплять синдекан-1 ниже сайта прикрепления хондроитинсульфата, тем самым вызывая отшелушивание эктодоменов синдекана-1 и, как следствие, потерю хондроитинсульфата и гиалуроновой кислоты. Было показано, что ингибирование ММП-9 и ММП-13 устраняет отшелушивание синдекана-1 в эндотелиальных клетках жировой подушечки крысы, что подтверждает важную роль этих протеаз в отшелушивании гликокаликса [327]. Zeng et al, также обнаружили, что S1PR-1 играет главную роль в восстановлении гликокаликса, в основном посредством запуска сигнального каскада фермента фосфатидилинозитол-3-киназы (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) [328]. Они провели серию экспериментов, в которых обедненные гликокаликсом эндотелиальные клетки обрабатывали S1P в присутствии или в отсутствие ингибитора PI3K Y294002 [328]. Результаты показали, что наличие Y294002 снижало содержание синдекана-1, хондроитинсульфата и гиалуроновой кислоты на поверхности клеток. Это позволяет предположить, что сигнальный путь S1P через зависимый от S1PR-1/PI3K путь является важным фактором восстановления гликокаликса.

Примечательно, что данные также свидетельствуют о том, что эндотелиальный гликокаликс может функционировать как сигнальная платформа, связывающая гемодинамические силы и S1PR. Например, в исследовании Jung et al, было продемонстрировано, что механочувствительные свойства эндотелиального гликокаликса способствуют поддержанию гомеостаза S1PR-1 путем интеграции изменений кровотока и активности рецептора. Они также обнаружили, что повышение напряжения сдвига способствует стабилизации гликокаликса за счет усиления активации эндотелиального S1PR-1, а делеция эндотелиального S1PR-1 была связана со снижением трансдукции кровотока в нижележащие вазопротекторные клеточные химические сигналы [128]. По-видимому, специфические компоненты гликокаликса также положительно регулируют передачу сигналов S1P. Гиалуронан высокой молекулярной массы связывается со своим рецептором CD44, который, в свою очередь, индуцирует кластеризацию в обогащенных кавеолином липидных рафт-микродоменах. Данные свидетельствуют о том, что CD44 обогащает S1PR1 в этих липидных рафтах, что приводит к активации рецептора. Это взаимодействие необходимо для поддержания барьерной функции сосудов [271]. Кроме того, фактор 2, подобный Krüppel (KLF2), является транскрипционным фактором, который регулирует экспрессию гиалуронансинтазы 2 [304], которая синтезирует гиалуронан и увеличивает продукцию поверхностного гиалуронана и S1PR1 [11]. Таким образом, механические стимулы, например, напряжение сдвига, активирующие фактор 2, подобный Krüppel, положительно регулируют как синтез гликокаликса, так и передачу сигналов S1P за счет увеличения экспрессии гиалуронансинтазы 2 и S1PR в эндотелиальных клетках.

Что касается S1PR-2, в настоящее время нет доказательств того, что эндотелиальный гликокаликс напрямую влияет на его экспрессию или активность. Напро-

тив, активация S1PR-2 была связана с подавлением пути PI3K посредством увеличения Rho-зависимой/PTEN-фосфатазной активности [254]. Неясно, существует ли прямая связь между S1PR-2 и отшелушиванием компонентов гликокаликса, но было показано, что активация S1PR-2 пагубно влияет на эндотелий, нарушая адгезионные контакты и, следовательно, усугубляя сосудистую проницаемость [254]. Повышенная экспрессия S1PR-2 в сосудистых тканях, подвергшихся воздействию нарушенного кровотока, воспаления и гипергликемии, может отчасти объяснить некоторые противоречивые данные, показывающие повышенные уровни циркулирующего S1P в состояниях, связанных с истощением гликокаликса, таких как диабет и инсулинорезистентность [90,142].

Активные формы кислорода

Подобно многим другим тканям, сосудистая стенка находится в постоянном процессе молекулярного окисления и восстановления. Множество сигнальных путей включают продукцию активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА), которые впоследствии восстанавливаются или инактивируются тканевыми антиоксидантными системами, защищающими молекулярные компоненты от окислительного стресса. АФК и АФА происходят из сбалансированных физиологических клеточных редокс-процессов. Однако при ряде патологических состояний возникает дисбаланс в пользу окисления. В сосудистом русле окислительный стресс обычно связан с протеолизом, деградацией гликокаликса, повышенной проницаемостью и эндотелиальной дисфункцией из-за связывания NO активными формами кислорода, что снижает биодоступность NO, нарушает вазодилатацию и способствует воспалению (**Рисунок 8**).

Основными источниками АФК в сосудистой стенке являются НАДФН-оксидазы (NOX), разобщенная eNOS, ксантиноксидаза (XO) и ферменты митохондриальной дыхательной цепи [73,77,97,126,149,151,251]. В физиологических условиях преобладает продукция АФК ферментами NOX. Дополнительные АФК образуются в результате взаимодействия NOX с другими источниками, включая ксантиноксидазу, разобщенную eNOS, митохондрии, циклооксигеназы и липоксигеназы [228,251,306]. Супероксидный анион является основной формой АФК, продуцируемой NOX-1 и -2, поврежденными митохондриями и разобщенной eNOS. Этот супероксид легко превращается в пероксид водорода супероксиддисмутазой (СОД) либо в цитозоле (СОД1), внутри митохондрий (СОД2) или вне клетки (СОД3). Супероксид также превращается в пероксинитрит при его реакции с NO, а пероксинитрит реагирует с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами с образованием 3-нитротирозина, который используется в качестве косвенного индекса окислительного стресса в тканях [95,277,335]. Токсичность пероксида водорода подавляется его превращением в кислород и воду с помощью каталазы или глутатионпероксидазы. В свою очередь, эффективность глутатионпероксидазы зависит от доступности восстановленного

глутатиона в сочетании с витамином Е, витамином С и липоевой кислотой [5,157,302]. В конечном счете, окислительный стресс возникает, когда количество производимых АФК превышает возможности антиоксидантных механизмов.

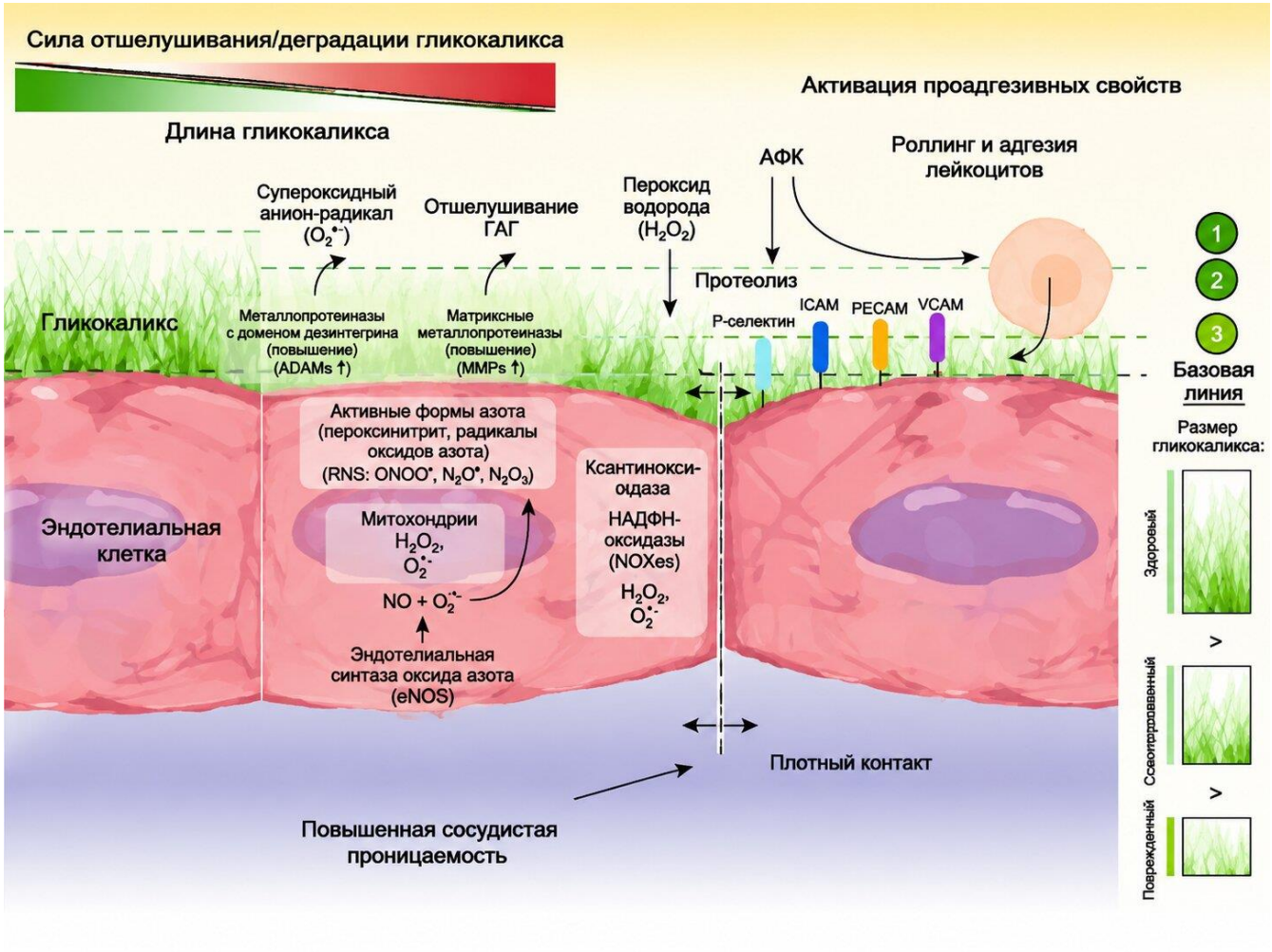


Рисунок 8. Схематическое изображение механизмов, способствующих деградации эндотелиального гликокаликса. Эндотелиальный гликокаликс подвергается постоянному процессу синтеза или адсорбции и деградации или отшелушивания. Деградация происходит в ответ на окисление гликозаминогликанов (ГАГ) активными формами кислорода (АФК), такими как оксид азота (NO), супероксид (O2•−) и H_2O_2, а также активными формами азота (АФА), такими как пероксинитрит (ONOO−), N_2O• или N_2O_3. Эти реактивные молекулы продуцируются множеством клеточных компонентов, включая митохондрии, эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), ксантиноксидазу и НАДФН-оксидазы (NOX). Деградация гликокаликса также происходит путем протеолиза или отшелушивания, опосредованного такими ферментами, как матриксные металлопротеиназы (MMP) и металлопротеиназы с доменом дезинтегрина (ADAM), среди прочих. Деградация гликокаликса, в свою очередь, повышает сосудистую проницаемость и позволяет обнажить провоспалительные рецепторы (например, P-селектин, ICAM, PECAM, VCAM), которые способствуют роллингу и адгезии лейкоцитов к сосудистому эндотелию.

На уровне эндотелиального гликокаликса АФК либо инактивируются антиоксидантными механизмами (в частности, СОД3), либо участвуют в деградации гликокаликса. Деградация происходит в основном либо путем прямой окислительной деструкции, либо посредством АФК-зависимой активации ферментов, которые отщепляют компоненты гликокаликса. Прямое окисление приводит к фрагментации и деполимеризации основных гликозаминогликанов, составляющих гликокаликс, включая хондроитин- и дерматансульфат [202], гепарансульфат [63] и гиалуронан [66]; тогда как к ферментам, отщепляющим компоненты гликокаликса, относятся нейраминидазы, гепараназа, гиалуронидазы, ММП и металлопротеиназы с доменом дезинтегрина (ADAM) [1,127,168,199,201,290]. Дополнительные, более сложные сигнальные каскады, инициируемые стимулами, которые увеличивают продукцию АФК, также завершаются отщеплением компонентов гликокаликса. В частности, воспалительные сигналы, индуцирующие экспрессию таких цитокинов, как фактор некроза опухоли (TNF)-α, также повышают активность множества шеддаз, включая ADAM10 и ADAM17. Было показано, что эти протеолитические ферменты отщепляют компоненты гликокаликса, включая эндомуцин и глипикан-1, истощение которых, соответственно, способствует взаимодействиям лейкоцитов с эндотелием и нарушению механочувствительности [132,323]. Предполагается, что окислительный стресс и избыточное отщепление компонентов гликокаликса инициируют порочный круг, который увеличивает продукцию АФК и способствует деградации гликокаликса. Это отчасти происходит потому, что гликокаликс защищен от окисления благодаря присутствию СОД3 в его структуре [4]. Следовательно, отщепление компонентов гликокаликса сопровождается потерей СОД3, что способствует окислительному стрессу, деградации гликозаминогликанов и активации металлопротеаз [4]. Это еще больше увеличивает разрушение гликокаликса и повышенную продукцию АФК ферментами NOX, присутствующими в эндотелии [72].

Следует подчеркнуть, что наличие интактной структуры гликокаликса благоприятствует продукции и активности антиоксидантных молекул и путей. Это связано с тем, что, помимо присутствия СОД3 в структуре интактного эндотелия, было показано, что стимуляция интактного эндотелиального гликокаликса ламинарным потоком увеличивает антиоксидантную сигнализацию. В частности, сообщалось, что однонаправленный ламинарный поток увеличивает количество и фосфорилирование ядерного фактора эритроидного фактора 2 (Nrf2), который является известным положительным модулятором антиоксидантных молекул и путей [235]. Этот путь зависит от наличия остатков сиаловой кислоты в гликокаликсе, поскольку удаление этих фрагментов ослабляет активацию Nrf2 ламинарным напряжением сдвига. Более того, эндогенные ферменты нейраминидазы, которые отщепляют сиаловую кислоту от гликановых цепей, повышаются в ответ на гипоксию, а также при патологиях, связанных с повышенным содержанием АФК в сосудистом русле, включая диабет, атеросклероз и рак [232]. Таким образом, потеря компонентов гликокаликса не

только снижает антиоксидантные свойства, присущие самой структуре гликокаликса, но и приводит к подавлению сигнальных путей, поддерживающих гомеостаз антиоксидантных ферментов.

Наконец, данные свидетельствуют о том, что отдельные компоненты гликокаликса обладают собственными антиоксидантными свойствами. Например, сиаловая кислота является эффективным нейтрализатором пероксида водорода [119]. Аналогичным образом, гликозаминогликаны в целом также обладают собственными антиоксидантными свойствами против как пероксида водорода, так и индуцированного металлами окислительного стресса [36,37]. В целом, данные указывают на то, что здоровый гликокаликс играет защитную роль против окислительного повреждения посредством прямых антиоксидантных эффектов, привязки антиоксидантных ферментов в своей структуре или посредством положительной регуляции сигнальных путей, подавляющих АФК. В условиях, когда эти защитные механизмы нарушаются, АФК способствуют прямой деградации гликокаликса и активируют шеддазы, которые удаляют его компоненты. Дальнейшее ухудшение состояния гликокаликса способствует воспалению и повышенной генерации АФК через процессы, которые, как считается, играют причинную роль в развитии и прогрессировании множественных сердечно-сосудистых патологий, включая атеросклероз [37,162], диабет [100,262] и старение [108].

ДЕГРАДАЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЛИКОКАЛИКСА

Гиалуроновая кислота и гиалуронидаза

Гиалуронан (или гиалуроновая кислота) — это повсеместно распространенный полисахарид, на долю которого приходится от 5 до 20% всех гликозаминогликанов, присутствующих в эндотелиальном гликокаликсе. Его структура состоит из повторяющихся дисахаридов, состоящих из N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты. В отличие от других гликозаминогликанов, гиалуронан сохраняет свой химический состав у разных видов, поскольку он не подвергается дальнейшей модификации путем сульфирования или эпимеризации [111]. Его неопределенная и обширная степень полимеризации делает гиалуронан длинным, неразветвленным, отрицательно заряженным высокоанионным полимером [96]. В растворе при физиологических условиях гиалуронан стабилизируется водородными связями. Это позволяет полимеру принимать жесткую спиралевидную конфигурацию и общую свернутую структуру, занимающую огромное трехмерное пространство. Гиалуронан располагается на люминальной поверхности эндотелиальных клеток, образуя гексагональную сеть в структуре гликокаликса. Его локализация в одной плоскости с поверхностью эндотелиальных клеток позиционирует гиалуронан во внутренней части гликокаликса и обеспечивает его функцию молекулярного сита [82]. Все эти характеристики гиалуронана способствуют избирательной проницаемости эндотелиального барьера, как описано ранее [66].

Три мембраносвязанных фермента, называемые гиалуронансинтазами 1–3, производят гиалуронан. Эти ферменты соединяют цитозольные субстраты — уридиндифосфат-глюкуроновую кислоту и уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин — через гликозидные связи с образованием полимера [124,304]. Этот синтез происходит в основном на внутренней поверхности плазмалеммы, а растущий полимер выводится через мембрану для формирования внеклеточного матрикса [111]. После высвобождения из фермента гиалуронан интегрируется в эндотелиальный гликокаликс посредством ряда различных механизмов, включая связывание с рецептором CD44, взаимодействие с хондроитинсульфатом и образование волокнистой сети путем самоорганизации [65]. У млекопитающих гиалуронансинтаза-2 является наиболее распространенной изоформой фермента, которая хорошо коррелирует с распределением гиалуронана и играет определяющую роль в развитии сосудов и эндотелиальном гомеостазе [289,304].

Гиалуронан синтезируется в виде высокомолекулярного (>500 кДа) или низкомолекулярного (10–500 кДа) полимера [45,52]. Кроме того, низкомолекулярная форма гиалуронана может образовываться в результате деградации его высокомолекулярных форм [278]. Высокомолекулярный гиалуронан преобладает в физиологических условиях и, как указывалось ранее, придает эндотелиальному гликокаликсу противовоспалительные, антиангиогенные и иммуносупрессивные свойства. Напротив, концентрация низкомолекулярного гиалуронана возрастает при патологических состояниях, и он обладает высокой воспалительной, ангиогенной и иммуностимулирующей активностью. В частности, небольшие фрагменты гиалуронана известны своей способностью стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а их присутствие в циркуляции связано с нарушением эндотелиального барьера и эндотелиальной дисфункцией [66].

Период полураспада гиалуронана в тканях составляет от нескольких часов до нескольких дней [93]. Как ферментативная, так и неферментативная деградация гиалуронана ответственны за его катаболизм и фрагментацию. У млекопитающих гиалуронидазы-1 и -2 являются основными ферментами, ответственными за деградацию этого гликозаминогликана на фрагменты размером от 2–6 дисахаридов до 20 кДа соответственно. У мышей с дефицитом этих двух ферментов наблюдается повышенный уровень гиалуронана в плазме, а также более толстая структура эндотелиального гликокаликса. Мыши с дефицитом гиалуронидазы-1 также защищены от изменений эндотелиального гликокаликса и эндотелиальной дисфункции, связанных с ранними стадиями сахарного диабета. Это подчеркивает актуальность деградации гиалуронана и этой ферментной системы в регуляции функции эндотелиального гликокаликса и диабетических сосудистых осложнений [64,223]. Неферментативная деградация гиалуронана в основном является результатом окисления, связанного с присутствием АФК, включая супероксидный анион, пероксид водорода, NO

и пероксинитрит [66]. Попав в циркуляцию, 85–90% фрагментов гиалуронана выводятся печенью, а остальные — почками [93]. Эта эффективная система способна справляться с деградацией от 10 до 100 мг фрагментов гиалуронана в день в крови человека [93]. Следовательно, уровни гиалуронана в кровотоке в любой отдельный момент времени являются результатом баланса между быстрым образованием и удалением фрагментов гиалуронана из циркуляции.

В целом, здоровый эндотелий связан со стабильностью гиалуронана. Ламинарное напряжение сдвига, воздействующее на культивируемые эндотелиальные клетки, увеличивает синтез гиалуронана и его включение в эндотелиальный гликокаликс [181,304]. В сравнении с этим, нарушенные паттерны потока связаны с уменьшением толщины эндотелиального гликокаликса [106], а воздействие низкого напряжения сдвига активирует гиалуронидазу-2, что приводит к отщеплению гиалуронана от эндотелиального гликокаликса [140]. Это указывает на то, что гемодинамические силы играют ключевую роль в модуляции стабильности гликокаликса и здоровья эндотелия.

Сиаловая кислота и нейраминидаза

Как отмечалось ранее, гликокаликс постоянно находится в процессе деградации и биосинтеза. Именно совокупность (баланс) этих процессов определяет размер или толщину, а также, предположительно, общий состав структуры гликокаликса.

Силы сдвига, создаваемые потоком крови, влияют как на синтез компонентов эндотелиального гликокаликса, так и на деградацию этой структуры. Анализы культур эндотелиальных клеток показали, что в статических (без потока) условиях образование гликокаликса носит крайне нерегулярный и прерывистый характер, что указывает на широкую степень гетерогенности его толщины и покрытия. Более того, считается, что экспрессия отдельных компонентов гликокаликса в статических условиях снижается. Напротив, поток, по-видимому, стимулирует экспрессию компонентов гликокаликса. Однако это не бинарная зависимость, при которой поток оказывает положительное влияние на экспрессию гликопротеинов и гликозаминогликанов, а отсутствие потока — отрицательное; скорее, это гораздо более сложная взаимосвязь, отражающая высокий уровень обратной связи между биосинтетическими процессами и специфическим типом потока в локальной среде, оказывающим силы напряжения сдвига на эндотелий.

Например, Dai et al, проанализировали характер потока в предрасположенных и устойчивых к атеросклерозу областях сонной артерии человека и обнаружили две отчетливо различающиеся формы волн напряжения сдвига. Они классифицировали их как атеропротективные или атеропронные (предрасполагающие к атеросклерозу) [53]. Примечательно, что при воздействии на эндотелиальные клетки человека в культуре эти две формы волн, различавшиеся по амплитуде, оказывали заметно различное влияние на клеточную архитектуру, воспалительные реакции и биосинтез

компонентов гликокаликса [53,141]. Кроме того, частота волны силы сдвига, по-видимому, также приводила к дополнительным различиям в результатах биосинтеза гликокаликса. Постоянное, стабильное (ламинарное) напряжение сдвига стимулировало синтез компонентов гликокаликса, тогда как низкое, осцилляторное напряжение сдвига было связано с деградацией гликокаликса [107,304]. Это подчеркивает сложную роль, которую гемодинамика играет в синтезе и деградации гликокаликса. Как было показано ранее, дополнительной сопутствующей проблемой является то, что гиалуронидаза — фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту, — активируется в условиях низкого напряжения сдвига и приводит к деградации гликокаликса [304,322].

В целом, процессы, регулирующие дифференциальные реакции эндотелия на ламинарный и нарушенный поток, до конца не определены. Однако появляющиеся данные свидетельствуют о том, что сиаловые кислоты играют определенную роль в реакциях биосинтеза и деградации клеточного гликокаликса на напряжения сдвига. В частности, ламинарный поток активирует путь Nrf2, что приводит к повышению уровня Nrf2 и его транслокации в ядро, где он стимулирует экспрессию ряда цитопротекторных белков, включая набор антиоксидантных генов [54]. Белки, расположенные ниже по пути активации Nrf2, создают внутриклеточные и внеклеточные условия, благоприятствующие биосинтезу компонентов гликокаликса. Напротив, осцилляторные напряжения сдвига способствуют деградации гликокаликса, и это сопровождается отщеплением остатков сиаловой кислоты от структур гликокаликса. Интересно, что экзогенно введенная нейраминидаза, которая расщепляет сиаловую кислоту, ослабляет активацию Nrf2 в клетках, подвергшихся воздействию ламинарного потока, и усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов, связанных с деградацией гликокаликса. Напротив, подавление эндогенной нейраминидазы-1 усиливает сигнализацию Nrf2 в ответ на деградацию, вызванную ламинарным потоком [235]. Эти данные имеют важное значение для здоровья человека, поскольку активность нейраминидазы в плазме и ее продукт — сиаловая кислота — повышены у людей и в моделях животных с патологиями, связанными со сниженной биодоступностью NO, включая старение [243], вызванное диетой ожирение [89] и диабет [209]. Более того, ряд исследований продемонстрировал, что экзогенно введенная нейраминидаза нарушает опосредованную потоком вазодилатацию и повышает окислительный стресс [144].

Другим процессом, связанным с деградацией гликокаликса, является способность клеток демонтировать прикрепленные гликановые цепи, когда срок жизни этих молекул подходит к концу. Рециклинг сиаловых кислот с поверхности клеточных гликопротеидов (гликоконъюгатов) происходит в эндосомах и лизосомах и опосредуется семейством ферментов нейраминидаз. Эти ферменты являются экзогликозидазами, так как они опосредуют удаление концевых сиаловых кислот (также

называемых нейраминовыми кислотами) от гликопротеинов, гликолипидов и олигосахаридов. В попытке стандартизировать номенклатуру предпочтительным названием для этих ферментов является «сиалидазы», тогда как термин «нейраминидаза» зарезервирован для вирусных ферментов в силу исторических причин (подтипы вируса гриппа идентифицируются по номеру H (для гемагглютинина) и номеру N (для нейраминидазы)). Для вируса гриппа существует 16 различных антигенов HA (H1–H16) и девять различных антигенов NA (N1–N9) [312]. У человека идентифицировано четыре сиалидазы, которые, несмотря на предпочтительную номенклатуру, известны как нейраминидазы 1–4 и дифференцированно экспрессируются в различных субклеточных локализациях. Считается, что нейраминидаза-1 высвобождает сиаловые кислоты из гликоконъюгатов, рециклируемых с плазматической мембраны, в эндосомальных и лизосомальных компартментах, тогда как было продемонстрировано, что нейраминидаза-2 функционирует в цитоплазме [200,236]. Нейраминидаза-3 связана с плазматической мембраной, а также с эндосомальными мембранами, и было показано, что она проявляет внеклеточную активность [246]. Изоформы нейраминидазы-4 обнаруживаются как во внутриклеточных мембранах, так и в митохондриях [200,319]. На данный момент систематической оценки экспрессии сиалидаз человека в различных типах клеток или тканях не проводилось. Таким образом, неизвестно, как экспрессия этих изоформ может различаться в разных органах. По имеющимся единичным данным, существует несколько исследований, изучающих специфические изоформы, обнаруженные в плазме/сыворотке человека, которые позволяют предположить, что только нейраминидаза-1 и нейраминидаза-3 присутствуют в плазме в измеримых уровнях, и что активность в плазме в основном обусловлена нейраминидазой-3 [324].

Помимо различий в субклеточной локализации, эти ферменты, по-видимому, обладают различной степенью специфичности к разным гликоконъюгатам. Более того, ферментативная активность колеблется между разными изоформами в зависимости от типа гликозидной связи (α 2-3, α 2-6 и т.д.) субстрата, а также от локального pH [194,240,280]. Хотя их прямая активность хорошо охарактеризована, роль, которую эти ферменты играют в различных клеточных процессах, досконально не исследована. Предполагается, что мембраносвязанные нейраминидазы играют роль в сигнальных путях, апоптозе и межклеточных взаимодействиях, тогда как остальные, как предполагается, опосредуют процессы клеточной дифференцировки и пролиферации. Интересно, что изоформы нейраминидазы, как было обнаружено, повышены при ряде сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с деградацией гликокаликса и эндотелиальной дисфункцией. К этим патологиям относятся диабет [42,257], сепсис [229], гипертензия [266], атеросклероз [101,104,311] и ожирение [89,211]. Кроме того, аномальная активность нейраминидазы также наблюдается при ряде различных злокачественных новообразований [193].

Гепарансульфат и гепараназа

Гепараназа — это эндогликозидаза, которая расщепляет внутренние полимерные цепи гепарансульфата в участках с пониженным сульфированием и, таким образом, способствует деградации и ремоделированию гликокаликса [231]. На сегодняшний день у млекопитающих идентифицирована только одна гепараназа, обладающая каталитической активностью. Однако существует второй неферментативный белок — гепараназа-2, который тесно связан с ней и, по-видимому, ингибирует активность гепараназы [160]. Неферментативные функции гепараназы в основном связаны с проангиогенными путями, которые положительно модулируют сигнальные пути фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [138,300]. Напротив, ферментативная активность гепараназы способствует ангиогенезу посредством высвобождения таких молекул, как фактор роста эндотелия сосудов и эпидермальный фактор роста, которые связаны с расщепляемыми ферментом фрагментами гепарансульфата. Помимо влияния на факторы роста, гепараназа также опосредует высвобождение хемокинов и цитокинов, встроенных в гликокаликс и также связанных с остатками гепарансульфата. К дополнительным физиологическим функциям, приписываемым гепараназе, относятся транскрипционная активация и экспрессия провоспалительных цитокинов TNF-α, интерлейкина (IL)-1, IL-6, а также активация системы врожденного иммунитета, образование экзосом и положительная регуляция аутофагии [300]. С патологической точки зрения, повышенная экспрессия гепараназы причастна к прогрессированию рака посредством положительной модуляции путей клеточного роста, ангиогенеза и метастазирования [300]. Она также причастна к опосредованию хронических воспалительных реакций и атеросклероза как при диабете, так и без него [12,102,301]. Кроме того, специфический вариант гепарансульфата, содержащий пентасахаридный мотив и синтезируемый эндотелиальными клетками, играет первостепенную роль в путях антикоагуляции благодаря его высокоаффинному взаимодействию с ингибитором протеаз антитромбином III [269]. Последний негативно регулирует свертывание крови в физиологических и патологических условиях путем ингибирования прокоагулянтных путей [225]. Важно отметить, что гепарины, секретируемые тучными клетками, также регулируют пути антикоагуляции. Однако, хотя они и сходны по структуре, они биохимически отличаются от гепарансульфатов, продуцируемых эндотелиальными и другими типами клеток [267]. В отношении его многочисленных связей с патологическими состояниями, деградация гепарансульфата особенно причастна к стимулированию тромбоза и прокоагулянтных сигнальных путей при атеросклерозе и сепсисе из-за его положительной роли в поддержании антикоагулянтного состояния [13,208,313].

Компоненты гликокаликса и другие шеддазы

Помимо трех основных ферментов, нацеленных на специфические компоненты гликокаликса, существуют дополнительные шеддазы с неспецифической (перекрестной) активностью в отношении множества мишеней, включая компоненты гликокаликса. К этим ферментам относятся семейства протеаз ADAM и матриксных металлопротеаз, причем первые причастны к отщеплению поверхностных белков и рецепторов клеток, а вторые характеризуются способностью расщеплять коллаген, фибронектин, эластин, ламинин и другие компоненты внеклеточного матрикса [238]. Примечательно, что оба семейства ферментов положительно регулируются активными формами кислорода (АФК) [207], которые являются распространенным побочным продуктом воспалительных патологий, и повышаются в патологических условиях, связанных с воспалением, включая гипертензию [58,81,118], диабет [154,281], атеросклероз [105,127], сепсис [87], ожирение [10, 185] и старение [70]. Что касается конкретных мишеней в гликокаликсе, то ADAM причастны к отщеплению синдекана-4, а также к повышению сосудистой проницаемости и воспалению при сепсисе [169,325]. Что касается матриксных металлопротеиназ, то они причастны к отщеплению синдекана-1 и -4 в условиях диабета [164]. Помимо отщепления компонентов гликокаликса, эти ферменты также высвобождают воспалительные цитокины, включая TNF-α, растворимый Toll-подобный рецептор 2, интерферон-γ, трансформирующий фактор роста-β, IL-4, IL-10, IL-13, IL-6 и фракталкин [26,58,150]. Это создает каскад прямой положительной связи, поскольку было показано, что воспалительные цитокины опосредуют отщепление гликокаликса [113,227] и повышают регуляцию матриксных металлопротеиназ [50,161] и ADAM [91,303].

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ГЛИКОКАЛИКС В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

По мере накопления исследований структуры и функции гликокаликса становится все более очевидным, что эндотелиальный гликокаликс играет центральную роль в поддержании здоровья сосудов. Действительно, многочисленные патологические состояния, сопровождающиеся дисфункцией сосудов, также связаны с отшелушиванием или деградацией эндотелиального гликокаликса (**Рисунок 9**). Основные патофизиологические последствия нарушенного или поврежденного эндотелиального гликокаликса трояки: 1) повышенная сосудистая проницаемость, 2) снижение биодоступности NO и 3) усиление воспаления. Из-за сложности оценки целостности гликокаликса и отсутствия систематических исследований по этой теме остается невыясненным, предшествует ли деградация гликокаликса развитию сердечно-сосудистых патологий, является ли она следствием изменений сосудистого гомеостаза в ответ на различные патологии или результатом комбинации обоих факторов. Ниже мы освещаем некоторые патологии, при которых деградация гликокаликса причастна к прогрессированию заболевания.

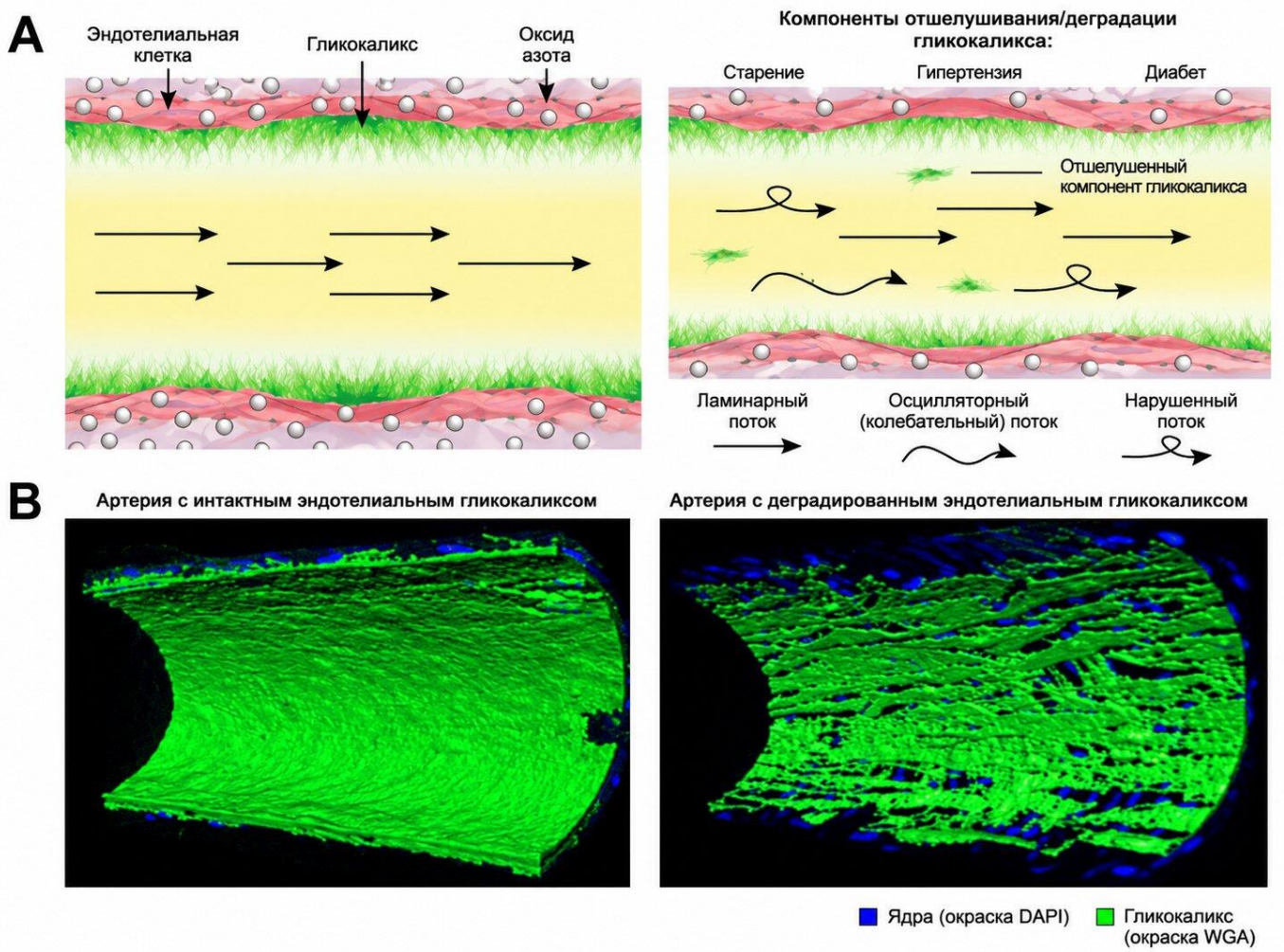


Рисунок 9. Гомеостаз эндотелиального гликокаликса зависит от надлежащего баланса между его деградацией (отшелушиванием) и биосинтезом (адсорбцией). Однако многочисленные состояния смещают этот баланс в сторону деградации гликокаликса. К таким состояниям относятся нарушенные паттерны кровотока, гипертензия, старение и диабет. Усиленная деградация гликокаликса делает сосудистое русло уязвимым для инфильтрации и адгезии патогенов и провоспалительных молекул, что приводит к сосудистому воспалению, атеросклерозу и эндотелиальной дисфункции.

A. Схематическое изображение здорового эндотелиального гликокаликса (левая панель) и гликокаликса, в котором нарушенный кровоток, гипертензия, старение или диабет способствовали его деградации.

B. Изображения изолированной мелкой артерии, полученные с помощью конфокального микроскопа, демонстрирующие эндотелиальный гликокаликс (окрашен агглютинином зародышей пшеницы (WGA), зеленый цвет) и ядра сосудистых клеток (окрашены 4′,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), синий цвет) до (слева) и после (справа) ферментативной деградации гликокаликса.

Атеросклероз

Атеросклеротические поражения возникают в результате отложения богатых холестерином липидов в стенке сосуда, что инициирует воспалительную реакцию, приводящую к образованию сосудистых поражений, называемых бляшками, которые со временем эволюционируют и становятся склонными к разрыву [122]. По мере прогрессирования заболевания ремоделирование сосудистого русла в ответ на формирование бляшки ограничивает кровоток и опосредует стеноз артерий. На более поздних стадиях заболевания после разрыва бляшки могут возникать тромбоз и инфаркт миокарда со значительным риском смертности. Одним из первых этапов, который, как предполагается, играет роль в развитии атеросклероза, является деградация эндотелиального гликокаликса. В сосудистом русле участки нарушенного кровотока, такие как изгибы или точки ветвления в артериальном дереве, не способствуют поддержанию здоровой структуры гликокаликса [288]. Именно в этих участках (называемых атеропронными) с деградированным гликокаликсом чаще всего образуются бляшки [38]. С механистической точки зрения, одним из инициирующих этапов прогрессирования атеросклероза является воспалительная реакция, опосредованная адгезией лейкоцитов к эндотелию. Электростатическая и барьерная (стерическое препятствие) природа гликокаликса препятствует адгезии лейкоцитов и выполняет функцию подавления воспалительных реакций [21]. В атеропронных областях сосудистого русла было продемонстрировано, что повреждение гликокаликса значительно усиливает адгезию лейкоцитов в кремастерной мышце хомяка и посткапиллярных брыжеечных венулах крысы [113,205]. Эти области также коррелируют с усилением захвата богатых холестерином липидов [192], что является важным инициирующим этапом запуска воспалительных реакций и стимулирования прогрессирования заболевания [166].

Сепсис

Сепсис — это системное воспалительное состояние, возникающее в результате воздействия инфекционного агента и несущее значительный риск смертности. Летальность возникает либо вследствие септического шока и полиорганной недостаточности в ответ на прямое высвобождение цитокинов, запускаемое воспалительной реакцией, либо из-за вторичной инфекции, вызванной иммуносупрессией в ответ на выброс цитокинов. Сепсис характеризуется повышенной сосудистой проницаемостью, которая, в свою очередь, опосредует экстравазацию белков и молекул из жидкой фазы крови. Возникающее в результате изменение концентрации растворенных веществ из просвета в окружающую ткань снижает онкотическое (коллоидно-осмотическое) давление, что приводит к уменьшению задержки воды в жидкой фазе, что является ключевым фактором развития органной недостаточности, вызванной сепсисом. Считается, что механизм вызванного сепсисом отека обусловлен повышенной сосудистой проницаемостью из-за деградации эндотелиального гликокаликса.

Потенциальными медиаторами деградации гликокаликса при сепсисе являются окислительный стресс, повышенная регуляция сигнального пути TNF-α, а также повышенная активность шеддаз, таких как ферменты ADAM, MMP, гепараназа-1, гиалуронидазы и нейраминидаза [103,259,263].

Гипертензия

Американская кардиологическая ассоциация (AHA) определяет гипертензию 1-й стадии как наличие систолического/диастолического артериального давления выше 130–139 / 80–90 [310]. Международное общество гипертензии (ISH) рассматривает эти параметры как высокое нормальное артериальное давление [284]. Хотя в развитие гипертензии вовлечены многочисленные независимые механизмы, натрий-зависимая (высокая чувствительность к соли) гипертензия связана с деградацией эндотелиального гликокаликса [221]. Предполагается, что гликокаликс функционирует как резервуар для положительно заряженных ионов натрия. Таким образом, в отсутствие здорового гликокаликса избыток ионов натрия проникает в эндотелиальные клетки и активирует сигнальные пути, которые положительно регулируют продукцию цитоскелетных волокон F-актина [85]. Это оказывает двойной эффект: повышает жесткость клеток и снижает продукцию NO, что увеличивает сосудистое сопротивление и артериальное давление [218].

Дополнительные наблюдения позволяют предположить, что гликокаликс может играть и другие роли в развитии гипертензии. Результаты Фремингемского исследования показывают, что артериальное ужесточение (повышение жесткости) предшествует развитию гипертензии [76,176,191], и предполагается, что деградация гликокаликса играет ключевую роль в повышении жесткости артерий. Используя метод прижизненной визуализации (GlycoCheck), исследователи продемонстрировали связь между уменьшением толщины гликокаликса и повышением центрального аортального давления, наряду с наблюдением, что уменьшенный эндотелиальный гликокаликс также был связан со снижением эластичности артерий или повышением их жесткости [120]. Также было продемонстрировано на модели индуцированной легочной артериальной гипертензии у крыс, что добавление гепарина для повышения целостности гликокаликса ослабляло развитие гипертензии [109].

Сниженная биодоступность NO также причастна к развитию гипертензии [163]. Предполагается, что деградация гликокаликса снижает активацию eNOS путем уменьшения механочувствительности/механотрансдукции сдвига. В поддержку этой гипотезы, VanTeeffelen et al, продемонстрировали, что деградация гликокаликса у мышей с помощью гиалуронидазы индуцировала базальную артериолярную вазоконстрикцию и приводила к уменьшению диаметра артериол в конце вмешательства по окклюзии сосудов и на пике реактивной гиперемии [293]. Дополнительные исследования на бедренных артериях собак показали, что обработка гиалурони-

дазой значительно снижает индуцированную потоком продукцию NO, но не индуцированную ацетилхолином продукцию NO [195]. Эти исследования подтверждают предпосылку о том, что здоровый гликокаликс положительно регулирует артериальное давление. Необходимы дополнительные исследования для определения механизма(ов), с помощью которых гликокаликс защищает от развития гипертензии. В частности, обусловлена ли защита от гипертензии барьерными, противовоспалительными или NO-генерирующими свойствами гликокаликса (или их комбинацией).

Интересно, что преэклампсия — угрожающее жизни повышение артериального давления, возникающее во время беременности, — связана с деградированным гликокаликсом [308]. Кроме того, при преэклампсии присутствуют три патологии, связанные с деградацией гликокаликса: повышенная сосудистая проницаемость с протеинурией [25], сниженная биодоступность NO [173,261] и усиленный воспалительный ответ или хроническая иммунная активация [47,198]. Неясно, несут ли эти нарушения индивидуальную или коллективную ответственность за наблюдаемое повышение артериального давления, или же за это отвечают другие механизмы.

Старение

Считать старение патологией — это несколько некорректно, поскольку вопрос о том, является ли старость самостоятельным заболеванием, остается предметом активных дискуссий. Достаточно сказать, что по мере старения организма происходит общее снижение функциональных возможностей на всех уровнях организации: от органов и тканей до отдельных клеток. То же самое справедливо и в отношении гликокаликса. У старых мышей наблюдалось, что микрососуды брыжейки и скелетных мышц имеют значительно меньшую толщину гликокаликса, чем микрососуды молодых мышей. При использовании прижизненной визуализации с помощью GlycoCheck та же тенденция наблюдалась в подъязычных артериях у пожилых людей по сравнению с молодыми [174]. Остается невыясненным, обусловлено ли это снижение целостности гликокаликса нарушением биосинтеза его компонентов или повышенной активностью (либо концентрацией) компонентов и процессов, разрушающих его структуру. В качестве альтернативы, существует ряд патофизиологических изменений, связанных со старением, включая гипергликемию, дислипидемию и повышенный окислительный стресс, которые способны разрушать гликокаликс. Например, сиалилирование эритроцитов снижается с возрастом у людей в процессе, связанном с повышением уровня активных форм кислорода (АФК), в частности перекисного окисления липидов [188]. Предположительно, гликокаликс, который подвергается тем же воздействиям, что и эритроциты, аналогичным образом теряет сиаловые кислоты в пожилом возрасте. Хорошо задокументировано, что АФК оказывают пагубное влияние на структуру и функцию гликокаликса [168,270]. Эта гипотеза хорошо согласуется с окислительной теорией старения, которая утверждает, что

накопление окислительных повреждений макромолекул опосредует функциональные потери в пожилом возрасте [165].

Рак

Рак объединяет ряд злокачественных новообразований с множеством различных этиологий, характеризующихся единым пагубным исходом: неконтролируемым клеточным ростом. Эволюция клетки в раковое поражение, угрожающее здоровью хозяина, включает накопление генетических мутаций, которые облегчают пролиферацию, локальную инвазию в непосредственном окружении, интравазацию в жидкую фазу крови, экстравазацию во вторичные очаги и последующую колонизацию новых тканей. В той или иной степени, гликокаликс и специфические модификации, вносимые в него самим раком, играют роль на каждом из этих этапов прогрессирования заболевания. На судьбу клеток, включая раковые, значительное влияние оказывают их биохимические взаимодействия с внеклеточным матриксом, включая гликокаликс [110,129]. Здесь мы осветим роль эндотелиального гликокаликса в сосудистой адгезии в биологии рака, но для более глубокого обзора роли гликокаликса при раке см. [33]. Повышенная экспрессия селектинов связана с метастазированием рака и неблагоприятными исходами для здоровья [210]. Селектины — это семейство углевод-связывающих белков, классифицируемых как лектины, экспрессируемых на поверхности лейкоцитов (L-селектин), эндотелиальных клеток (E-селектин), а также тромбоцитов и эндотелиальных клеток (P-селектин), которые облегчают процессы адгезии в сосудистом русле. Считается, что эта адгезия имеет решающее значение для метастазирования, облегчая прикрепление опухолевых клеток к сосудистой стенке. Исследования продемонстрировали, что опухолевые клетки способны связываться по крайней мере с одним классом селектинов, и что у животных моделей с дефицитом селектинов наблюдается замедленный рост опухолей и сниженный метастатический фенотип [22].

Одним из фрагментов, участвующих в связывании селектина, являются сиалилированные гликановые эпитопы [51], что подразумевает, что повышенное сиалилирование благоприятствует процессам адгезии и метастазирования. Действительно, было задокументировано, что гликокаликс опухолевых клеток характеризуется аномальным гликозилированием и повышенной степенью сиалилирования [129,333]. Гиперсиалилирование наблюдается в опухолях по сравнению с нормальной, незлокачественной тканью того же типа, а также в сыворотке пациентов с широким спектром различных видов рака по сравнению с плазмой здоровых субъектов [34,332]. Кроме того, уровень сиаловой кислоты повышен в плазме пациентов с раком головы и шеи, молочной железы, эндометрия, колоректальным раком, раком легких и полости рта [285]. Предполагается, что гиперсиалилирование возникает из-за усиления биосинтетических путей, например, повышения активности сиали-

лтрансфераз [55]. Примечательно, что ферменты нейраминидазы, удаляющие сиаловую кислоту, при раке регулируются дифференцированно. Например, изоформа нейраминидазы-3 повышена при ряде видов рака [29,133], и предполагается, что она положительно влияет на метастатический потенциал и инвазивность [193,265]. Напротив, сообщается, что нейраминидаза-1 понижена при ряде видов рака, что указывает на противоположную или дифференциальную активацию сигнальных путей этими различными изоформами нейраминидазы. Что касается нейраминидазы-2, исследования показывают, что она обладает антиметастатическим действием, связанным с путями апоптоза, при трансфекции в линии опухолевых клеток, но ее роль *in vivo* в патологиях рака у человека неясна [194]. Подобно нейраминидазе-2, было показано, что нейраминидаза-4 повышает чувствительность к путям апоптоза при трансфекции в линии опухолевых клеток человека [320]. Также было показано, что мРНК нейраминидазы-4 снижена в некоторых опухолях человека, что может влиять на инвазивность опухоли [320]. Это позволяет предположить, что нейраминидаза-4 также оказывает негативное влияние на прогрессирование рака, но ее полная роль при раке еще не до конца определена. Достаточно сказать, что изменения в гликокаликсе, в частности в остатках сиаловой кислоты, играют критическую роль в развитии и прогрессировании рака.

Более того, помимо опосредования адгезии раковых клеток к сосудистой стенке, гиперсиалилирование, по-видимому, помогает опухолевым клеткам уклоняться от иммунного надзора путем связывания с сиглеками (*иммуноглобулиноподобные лектины, связывающие сиаловую кислоту*), которые посылают иммунной системе сигнал о том, что опухоль является частью здоровой ткани хозяина [49,135]. Праймирование иммунной системы для распознавания опухолей становится мощным терапевтическим инструментом для уничтожения раковых поражений. Одним из подходов, предпринятых для нацеливания на опухоль с целью иммунного распознавания, является специфическая блокада сиглеков или, в более общем плане, удаление сиаловых кислот из опухоли путем ингибирования сиалилтрансфераз в биосинтетическом пути [15,206,286].

Сердечно-сосудистые осложнения при сахарном диабете

Сахарный диабет связан с тяжелым и прогрессирующим сердечно-сосудистым заболеванием (ССЗ). Ключевым механизмом, причастным к патогенезу диабетических ССЗ, является эндотелиальная дисфункция, которая характеризуется окислительным стрессом, хроническим воспалением, сниженной биодоступностью NO и нарушением эндотелий-зависимой вазодилатации. Поскольку деградация гликокаликса приводит к эндотелиальной дисфункции, исследователи изучали роль деградации гликокаликса в качестве центрального фактора развития ССЗ, связанных с диабетом.

Действительно, несколько исследований предоставляют доказательства деградации гликокаликса при диабете. Например, в доклинической модели диабета

Szymonski et al, показали, что самцы мышей db/db демонстрируют уменьшение длины гликокаликса (оцененное с помощью атомно-силовой микроскопии) в сочетании с эндотелиальной дисфункцией [275]. Аналогичным образом, Zuurbier et al, обнаружили, что гипергликемия (25 ммоль/л) связана с повышением проницаемости гликокаликса с параллельным усилением сосудистой проницаемости [336]. На грызунной модели диабетической ретинопатии Kumase et al, сообщили об уменьшении толщины гликокаликса в сосудах сетчатки у мышей с диабетом по сравнению с контрольной группой [145]. Аналогичным образом, на модели нефропатии (мыши DBA2J со стрептозотоцин-индуцированным диабетом) была задокументирована потеря длины клубочкового гликокаликса [222]. В поддержку роли деградации гликокаликса в генезе эндотелиальной дисфункции при диабете Dogné et al, показали, что делеция гиалуронидазы-1 у самцов мышей с гипергликемией привела к увеличению толщины гликокаликса и сохранению его структуры, что сопровождалось улучшением эндотелиальной дисфункции, индуцированной гипергликемией [67].

Метформин, препарат первой линии для лечения диабета, изучался в качестве стратегии предотвращения деградации гликокаликса на модели диабета [78]. В том исследовании у мышей db/db, получавших метформин с питьевой водой в течение двух недель, наблюдалось улучшение барьерных свойств гликокаликса по сравнению с контрольными мышами. Примечательно, что этот короткий курс метформина не привел к значительным изменениям уровня гликемии [78].

У людей сообщалось о схожих результатах. Nieuwdorp et al, индуцировали транзиторную гипергликемию у здоровых мужчин с помощью гипергликемического клэмпа (16 ммоль/л) и наблюдали выраженное снижение объема гликокаликса, которое совпало с повышением уровня циркулирующих компонентов гликокаликса в плазме, таких как гиалуронан, а также с нарушением опосредованной потоком вазодилатации плечевой артерии. Важно отметить, что снижение объема гликокаликса в значительной степени предотвращалось лечением антиоксидантным препаратом, что указывает на окислительный стресс как на механизм, причастный к вызванной гипергликемией деградации гликокаликса [214]. Также сообщалось, что у мужчин с сахарным диабетом 1 типа объем эндотелиального гликокаликса снижен по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы [212]. Более того, было показано, что у этой популяции пациентов с диабетом также повышены циркулирующие маркеры деградации гликокаликса [214] и имеется значительная корреляция между уровнями гиалуронана в плазме и толщиной комплекса интима-медиа сонной артерии [215].

Для уменьшения деградации гликокаликса при диабете использовались различные терапевтические стратегии. Например, Vink et al, показали, что введение сулодексида в течение двух месяцев эффективно частично восстанавливает эндотелиальный гликокаликс у мужчин с хорошо контролируемым диабетом 2 типа без исто-

рии ССЗ [31]. Терапия сулодексидом обеспечивает доступность компонентов гликокаликса для адсорбции, а также предшественников, необходимых для синтеза гликозаминогликанов. Совсем недавно в крупном клиническом исследовании изучалось влияние часто используемых антидиабетических препаратов на объем гликокаликса [121]. Сто шестьдесят пациентов с диабетом 2 типа были рандомизированы для получения инсулина, лираглутида (аналог рецептора глюкагоноподобного пептида-1), эмпаглифлозина (ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 типа) или комбинации лираглутид + эмпаглифлозин в качестве дополнения к метформину. Субъекты проходили обследования на исходном уровне, а также через 4 и 12 месяцев лечения. Через 12 месяцев все три группы лечения продемонстрировали улучшение PBR (перфузируемого пограничного региона) микрососудов подъязычной артерии (маркер целостности эндотелиального гликокаликса по данным GlycoCheck) и скорости распространения пульсовой волны (маркер жесткости артерий). Однако, несмотря на сопоставимый гликемический контроль по сравнению с группой инсулина, у субъектов, получавших лираглутид и эмпаглифлозин, наблюдалось большее улучшение объема гликокаликса. Важно отметить, что у субъектов в группе комбинированной терапии также наблюдалась более выраженная потеря веса во время исследования [121]. Примечательно, что в настоящее время многочисленные клинические исследования у пациентов с диабетом 2 типа продемонстрировали, что использование терапии лираглутидом и эмпаглифлозином связано со снижением частоты сердечно-сосудистых событий и сердечно-сосудистой смерти [182,334]. Однако в какой степени кардиопротекторное действие лираглутида и эмпаглифлозина объясняется восстановлением гликокаликса, еще предстоит определить.

ОЦЕНКА ЦЕЛОСТНОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЛИКОКАЛИКСА

Исторически важность эндотелиального гликокаликса не была полностью осознана, поскольку считалось, что его основная функция ограничивается защитным покровом, заключающим клетки в сахарную оболочку, независимо от взаимодействия с биохимическими сигнальными путями и их регуляции. Однако этот наивный взгляд быстро меняется по мере того, как становится все более очевидной важность гликокаликса в поддержании здоровья сосудов. Одним из факторов, препятствующих изучению гликокаликса, и причиной, по которой его важность для здоровья сосудов не была полностью охарактеризована, является то, что это очень сложная для изучения структура. Сложность визуализации и оценки гликокаликса объясняется рядом технических проблем, которые препятствовали полной характеристике и пониманию его структуры и функции в поддержании сосудистого гомеостаза, а также того, как его деградация способствует множеству различных патологий, включая диабет, гипертензию и воспаление. Проблемы, присущие изучению гликокаликса, хорошо охарактеризованы в обзоре Mockl et al, [196]. Кратко они выделяют три основных препятствия.

- *Во-первых,* считается, что глубина гликокаликса простирается ненамного больше дифракционного предела света (~250 нм). Следовательно, традиционные методы световой микроскопии не способны адекватно приблизиться к размерам гликокаликса и не подходят для идентификации тонких структур внутри него. Использование методов электронной микроскопии для преодоления этого дифракционного ограничения не решило проблему адекватно. Примечательно, что олигосахариды, составляющие гликокаликс, довольно лабильны и, вероятно, подвержены воздействию фиксации, необходимой для обработки при электронной микроскопии. Более того, этот подход не позволяет дифференцировать отдельные компоненты гликокаликса, поскольку большинство красителей, используемых для его визуализации, представляют собой катионные молекулы, такие как лантан, альциановый синий и рутениевый красный, поэтому их связывающие свойства зависят от заряда, а не от специфического гликана [204].
- *Вторым препятствием* является тот факт, что олигосахариды, составляющие гликокаликс, являются вторичными продуктами генов. То есть их образование не является простым результатом экспрессии гена с последующей трансляцией белка. Скорее, их сборка и прикрепление к протеогликанам происходят в нескольких клеточных компартментах, а также во внеклеточном пространстве. Это делает их подверженными регуляции множеством факторов, включая, помимо прочего, метаболическое и редокс-состояние клетки [62,139], а также гемодинамические явления, такие как концентрации метаболитов и силы сдвига, возникающие в жидкой фазе крови [304,316]. Кроме того, существует большая степень функционального перекрытия ферментов, участвующих в биосинтезе всех компонентов гликокаликса. Эта переплетенная сложность как в механизмах, так и в сборке не способствует традиционным генетическим подходам к маркировке компонентов или использованию технологий нокаута для идентификации регуляторных путей.
- *Последним препятствием* является то, что различия в моносахаридах могут быть химически тонкими, то есть замена одной функциональной группы. Тем не менее, эти небольшие различия могут иметь глубокие функциональные последствия. Это делает невероятно сложной задачу маркировки уникальных молекул гликанов.

Со временем было разработано множество инновационных подходов для преодоления препятствий, мешающих оценке гликокаликса, с неоднозначными результатами. Для визуальной оценки гликокаликса использовались различные микроскопические методы, включая электронную, интравитальную и конфокальную микроскопию. Van Den Berg et al, использовали модифицированный подход электронной микроскопии для получения невероятно детальных изображений капилляра левого желудочка крысы, что позволило оценить длину гликокаликса в диапазоне 200–500

нм. Наши собственные попытки воспроизвести этот подход (**Рисунок 10**) привели к неоднозначным результатам с гетерогенным окрашиванием в разных образцах. То, что в литературе существует лишь несколько примеров использования этого подхода, подчеркивает трудность применения этой методики для визуализации гликокаликса [158,287]. Более того, как упоминалось ранее, неясно, как на гликокаликс влияет процесс фиксации и дегидратации, и этот подход не позволяет дифференцировать отдельные гликановые структуры.

Для визуализации гликокаликса *in vivo* было разработано несколько интравитальных подходов. Флуоресцентно меченый лектин агглютинина зародышей пшеницы, который избирательно связывает сиаловую кислоту, использовался для окрашивания гликокаликса [131,147,244,252]. По нашему опыту, этот подход не очень подходит для точной оценки размеров гликокаликса из-за различий в интенсивности окрашивания между образцами. Чтобы преодолеть это ограничение, исследователи объединили различные флуоресцентные красители, в которых один краситель маркирует жидкую фазу крови, а другой — поверхность эндотелиальных клеток. Разница в пиковой интенсивности двух флуорофоров используется для определения ширины или длины гликокаликса [24]. Salmon et al, использовали этот подход для оценки длины гликокаликса в обнаженных брыжеечных сосудах мыши. Одним из недостатков этого подхода является то, что липофильный краситель (R18), используемый для маркировки люминальной эндотелиальной мембраны, не ограничивается люминальной (апикальной) поверхностью и в конечном итоге будет маркировать базальную мембрану эндотелиальной клетки, а также подлежащие гладкомышечные клетки. Таким образом, факторы, не связанные с гликокаликсом, которые влияют на текучесть мембраны, могут влиять на результаты.

Совсем недавно аналогичный подход был применен с использованием световой микроскопии для косвенного измерения ширины эндотелиального гликокаликса у людей. Кратко, этот подход измеряет ширину сосудистой стенки, а также ширину столба эритроцитов в капиллярах подъязычной области с помощью прибора GlycoCheck. Затем алгоритм рассчитывает ширину гликокаликса, которая исключает контакт эритроцитов со стенкой сосуда [249]. Дополнительные подходы к визуализации использовали микроскопию сверхвысокого разрешения [196], а также новые методы сколов-реплик в сочетании с трансмиссионной электронной микроскопией [74]. К ограничениям этих подходов относится то, что обычно это неестественные исследования гликокаликса в культивируемых клетках. Поэтому неясно, насколько точно модели клеточных культур воспроизводят эндогенную структуру, поскольку в них отсутствуют специфические гемодинамические, а также метаболические и структурные особенности, обнаруживаемые *in vivo*.

Примечательно, что все вышеперечисленные подходы дали разные измерения длины гликокаликса. Стандартная трансмиссионная электронная микроскопия в

клеточной культуре оценила длину гликокаликса примерно в 40 нм. Напротив, подход с использованием электронной микроскопии сколов-реплик оценил длину гликокаликса как близкую к 11 мкм в эндотелиальных клетках аорты крупного рогатого скота [74]. Интравитальные методы на животных моделях указывают на среднюю длину гликокаликса от 1,5 до 2,5 мкм [24,244]. Все эти результаты подчеркивают трудность определения длины гликокаликса с использованием различных подходов оптической микроскопии.

Помимо визуализации гликокаликса, существуют альтернативные подходы, которые пытаются измерить его длину с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), одновременно оценивая жесткость субстрата. В этом подходе изолированные аорты вскрываются *en face* (послойно/плашмя), а поверхность, покрытая обнаженным гликокаликсом, зондируется (подвергается индентации) сферическим зондом атомно-силового микроскопа (**Рисунок 10**). Затем алгоритм, использующий модель «щетки» (Brush model), анализирует кривые индентации для определения как длины гликокаликса, так и жесткости нижележащих клеток. Этот подход был использован для демонстрации уменьшения длины гликокаликса на животной модели диабета по сравнению с контрольными животными [275].

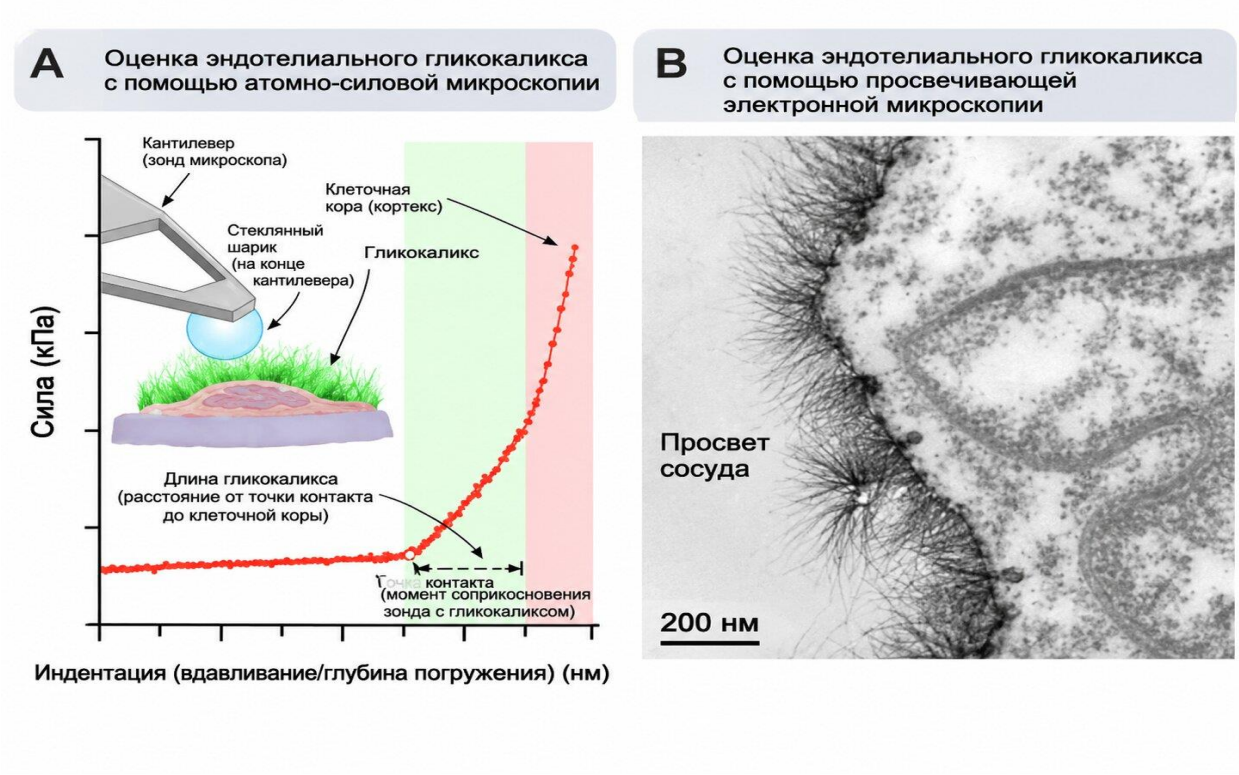


Рисунок 10. Эндотелиальный гликокаликс очень хрупок и труден для измерения. На сегодняшний день двумя часто используемыми методами, обеспечивающими прямые измерения характеристик эндотелиального гликокаликса *ex vivo* в условиях *in situ*, являются атомно-силовая микроскопия (АСМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).

A. АСМ позволяет измерять длину и жесткость гликокаликса на основе кривых зависимости силы от расстояния, генерируемых, когда кантилевер АСМ приближается к структурам гликокаликса и деформирует их в изолированных сосудистых препаратах, вскрытых *en face,* или в культивируемых эндотелиальных клетках.

B. ПЭМ позволяет визуализировать структуры эндотелиального гликокаликса с наивысшим на сегодняшний день разрешением в микроскопии, хотя и требует сложной подготовки образцов (масштабная линейка = 200 нм).

Одной из критических замечаний в адрес этого подхода является то, что он не является измерением *in vivo*, и неясно, какие изменения происходят при подготовке образца. Поскольку фиксация и дегидратация при подготовке образца не требуются, предполагается, что эти эффекты будут довольно минимальными по сравнению с другими методами *ex vivo*. Явным преимуществом этого подхода является то, что можно разрабатывать эксперименты, исключающие предвзятость (длину гликокаликса определяет алгоритм), что позволяет проводить более точные оценки патологий, влияющих на гликокаликс.

Заключение

Эндотелиальный гликокаликс играет центральную роль в поддержании здоровья сосудов посредством регуляции сосудистой проницаемости и своей механической способности трансдуцировать напряжение сдвига и способствовать продукции NO. Более того, эти процессы функционируют в тандеме для поддержания сосудистого гомеостаза и действуют как оплот для подавления воспаления, являющегося коренной причиной развития и прогрессирования сердечно-сосудистых патологий. В данном обзоре мы осветили биохимические компоненты гликокаликса, причастные к опосредованию этих процессов, и определили на примере ряда патологий, каким образом эти процессы нарушаются после деградации гликокаликса. Кроме того, мы представили современные передовые практики оценки целостности гликокаликса и измерения его физических размеров с использованием спектра подходов, применимых как к моделям *in vivo*, так и к моделям *in vitro*. Поскольку осознание первостепенной роли гликокаликса в предотвращении и/или смягчении сердечно-сосудистых патологий продолжает расти, в настоящее время разрабатывается множество методов терапии, нацеленных либо на усиление биосинтеза (адсорбции), либо на снижение деградации, для воздействия на эту структуру с целью ее защиты или восстановления.

БИБЛИОГРАФИЯ ЭТОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО И СЛОЖНОГО ДЛЯ ПЕРЕВОДА ТЕКСТА ДОСТУПНА В ОРИГИНАЛЬНОЙ АНГЛОЯЗЫЧНОЙ ВЕРСИИ ДАННОЙ СТАТЬИ ПО АДРЕСУ:

Compr Physiol.; 12(4): 3781–3811. doi:10.1002/cphy.c210029.