

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© А. В. Максименко, 2008

А. В. Максименко

## ЭФФЕКТЫ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В СОСУДИСТЫХ СОБЫТИЯХ

Институт экспериментальной кардиологии, ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, Москва, Россия

При острых сердечно-сосудистых поражениях функциональное восстановление миокарда наблюдалось при достижении достаточной реперфузии инфаркт-связанной артерии как и адекватного уровня микроциркуляции и тканевого потока в поврежденном регионе. Регулятором этих явлений выступает, в частности, гликозаминогликановая компонента клеточной оболочки эндотелия (гликокаликс, экстрацеллюлярный матрикс, интерстиций), ферменты и ингибиторы ее катаболизма. Рассмотрены причины и последствия разрушения гликокаликса при сосудистом поражении и возможности гликокаликсной реконструкции. Выделена способность гликобелкового окружения клеток регулировать биомеханические свойства сосудов, сборку и репарацию тканей, связывать низко- и высокомолекулярные лиганды. Гидратация гликозаминогликанов определяет развитие тканевых отеков и опосредует антикоагулянтную активность экстрацеллюлярного матрикса. Отмечено связывание гликозаминогликанов с хемокинами, факторами роста, другими белками, липопротеидами для реализации регуляторной функции. Показано наличие особых структурных участков связывания у таких реактантов и зависимость биологических эффектов, вызываемых гликозаминогликанами, от величины их молекулярной массы. Проведен обзор участия гликозаминогликанов в патофизиологических процессах при сосудистых нарушениях и подходов к регуляции состояния околочелюточной оболочки, обещающих средства точного и эффективного контролирования уровня гликозилирования биообъектов.

Сердечно-сосудистые заболевания остаются одной из ведущих причин заболеваемости и смертности населения экономически развитых стран в XXI веке. Нарушения кровотока, обуславливающие развитие стабильной и нестабильной стенокардии, инфаркта миокарда, внезапной сердечной смерти, составляют весомую долю сердечно-сосудистых патологий. Их сокращению способствовало изучение биохимии активаторов пламиногена. На основе последних были разработаны тромболитические препараты, позволившие существенно снизить смертность от инфаркта миокарда. Эти лечебные подходы, их режимы и приемы вместе с ангиопластикой сформировали реперфузионную терапию. Наряду с этим методами позитронной эмиссионной томографии впервые было показано у пациентов с острым инфарктом миокарда достоверное ухудшение миокардиальной тканевой перфузии после успешного тромболитического из-за разрушения капиллярной сети (микроциркуляции) ишемией [1]. Даже при достижении высокой степени проходимости закупоренного ранее инфаркт-связанного сосуда (TIMI grade 3) сниженная интенсивность миокардиальной перфузии/тканевого потока обуславливала ухудшенный прогноз и высокий риск смертности [2, 3] пациентов в сравнении с группой нормальной перфузии тканей. Функциональное восстановление миокарда наблюдалось только при адекватном восстановлении уровня

тканевой перфузии инфарктированной территории [1]. Таким образом, успех реперфузионной терапии определялся помимо восстановления кровотока в окклюзированном сосуде еще и улучшением тканевой проницаемости и устранением дисфункции микроциркуляции, а также защитой от “реперфузионного поражения” [4], обусловленного развитием оксидативного стресса. Ориентировочно 25 % пациентов с восстановленным уровнем кровотока в эпикардиальной инфаркт-связанной артерии не имеют реперфузии миокарда на тканевом уровне. Накапливаемые данные определяли цель реперфузионной терапии — скорейшее восстановление нормальной эпикардиальной и миокардиальной перфузии [4]. Ухудшение последней связывалось с засорением микроциркуляторного русла тромботическими массами лизирующегося тромба [5], повышенной агрегацией тромбоцитов, эмболизацией атеросклеротическим дебрисом [6], растущим при ишемии гликозаминогликановым/мукополисахаридным барьером на сосудистой стенке для проникновения лекарственных агентов [7]. В целях достижения “идеального” лечения — быстрого обеспечения “макро” и “микро” проходимости сосудов и улучшения тканевого потока — исследуют биохимически и клинически ингибиторы агрегации тромбоцитов [4, 6] и констрикторов [8], вазодилататоры [6], регуляторы тканевой проницаемости [7, 9]. Первые 2 аспекта уже

совершенствуются в рамках развития антитромботической и гипотензивной терапии. Менее изучено направление, подразумевающее исследование взаимодействия люминальной сосудистой поверхности и стенки с метаболитами крови. В настоящее время этот аспект изучений претерпевает вместе с гликobiологией начальный период развития и вызывает заметный быстро растущий интерес исследователей. Именно на гликозаминогликановом влиянии на состояние микроциркуляции сосредоточено настоящее обзорное рассмотрение.

### **Околклеточная оболочка – гликокаликс и экстрацеллюлярный матрикс**

Обогащенная углеводами периферическая зона на поверхности большинства эукариотических клеток представляет собой клеточную оболочку или гликокаликс. Олигосахаридные цепи гликокаликса ковалентно присоединены к мембранным белкам (гликопротеины) и в меньшей мере к липидам (гликолипиды). Гликолипиды и протеогликианы могут секретироваться клетками и адсорбироваться на их поверхности. Протеогликианы состоят из большого числа гликозаминогликановых полимерных цепей, присоединенных к белковой основе/кору. Высокая концентрация углеводов на клеточной поверхности служит сетевым барьером для потока растворенных веществ [10] и защищает клетки от поражения [11]. Так, эндотелиальная поверхность капилляров миокарда крыс покрыта слоем углеводов толщиной 0,2 – 0,5 мкм [11]. Массовое содержание углеводов в плазматических мембранах составляет от 2 до 10 %. Из множества природных моносахаридов в мембранных гликопротеинах и гликолипидах встречаются лишь 9, основные из которых: глюкоза и глюкозамин, галактоза и галактозамин, манноза и фукоза, а также обычная для терминального положения в углеводной цепи сиаловая кислота.

Гликозаминогликановые цепи протеогликанов, участвующие в процессах гомеостаза, имеют полимерную (гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат) и сополимерную (гепарансульфат и дерматансульфат) структуру (рис. 1) [12]. Эти углеводные производные широко представлены во внеклеточном матриксе. Он состоит из ламинина и фибронектина, коллагена и витронектина, протеогликанов (версикана, бигликана, декорина, перлекана, синдекана и др. Указанные протеогликианы имеют разные посттрансляционные гликозаминогликановые компоненты [13]. Бигликан и декорин представляют собой хондроитинсульфат/дерматансульфат протеогликианы интерстициального матрикса с маломолекулярной белковой основой. Версикан — внеклеточный хондроитинсульфат протеогликан, перлекан — гепарансульфатпротеогликан базальной мембраны/внеклеточного матрикса. Синдекан — хондроитинсульфат/гепарансульфат протеогликан [14, 15]. Их локализация весьма разнообразна). Гликозаминогликановый состав коронарных артерий человека меняется в ходе жизнедеятельности. Отмечен рост содержания сульфатированных гликозаминогликанов, особенно хондроитинсульфата и дерматансульфата при атерогенезе [16]. При этом состав гликозами-

ногликанов (ГАГ) может влиять на стабильность атеросклеротических бляшек [17], обнаруживая накопление гиалуронана и хондроитинсульфата по центрам их эрозии. С другой стороны, изменение ГАГ состава может повышать антитромботическую защиту сосудистой стенки [18]. В миокардиальной артерии, расположенной под внутримышечным мостиком, где обычно отсутствуют тромботические отложения и атеросклеротические поражения, отмечается повышенное на 47 % содержание ГАГ по сравнению с расположенными рядом пре- и постсегментами сосуда. Повышенное содержание ГАГ не приводило к утолщению артериальной стенки. Содержание дерматансульфата возрастало в 1,8 раза, а гепарансульфата — в 1,6 раза. Последнее подчеркивается авторами особо, как причина повышения атерогенности сосудистой стенки при ее деформации компрессионными силами волокон миокардиального мостика во время систолического давления, как и при развитии атеросклеротических и тромботических событий [18]. Присутствие указанных ГАГ дает вклад в сосудистую целостность и ремоделирование.

Предполагается, что клетки эндотелиального монослоя кровеносных сосудов, расположенные на нормальном экстрацеллюлярном матриксе, неподвижны. Компоненты экстрацеллюлярного матрикса, являющиеся частью базальной мембраны необычайно высокой эластичности и растяжимости, синтезируются и секретированы, в частности, эндотелием в ходе ангиогенеза и васкулогенеза. Эндотелий зрелых сосудов имеет способность постоянно ремоделировать экстрацеллюлярный матрикс [19]. Установка артериального шунта у бабуинов при нормальном напряжении сдвига эндотелиального слоя ведет к появлению неоинтимального утолщения, богатого гиалуронаном и версиканом, а вблизи шунта — коллагеном и бигликаном [20]. Высокое напряжение сдвига способствует регрессии неоинтимы с потерей протеогликанов и деградацией версикана. Взаимодействие последнего с интегринами эндотелиальной поверхности генерирует сигналы, которые ингибируют пролиферацию и миграцию эндотелия и стимулируют адгезию клеток друг с другом и с экстрацеллюлярным матриксом. Полагают, что частота стенозов (15 – 30 % в течение 6 месяцев с их установки) обусловлена повышенным накоплением экстрацеллюлярного матрикса скорее, чем клеточной пролиферацией [21]. Отмечено общее присутствие версикана, бигликана, перлекана, гиалуронана. В период до 18 месяцев после ангиопластики экстрацеллюлярный матрикс стеновой области похож на не полностью зажившую рану, отличаясь повышенным содержанием версикана, гиалуронана, коллагена III типа [22]. В последующее время (свыше 18 месяцев) наблюдалось накопление декорина, коллагена I типа и достоверное снижение плотности экстрацеллюлярного матрикса и стенового стеноза. Поэтому сокращение/сжатие экстрацеллюлярного матрикса предлагается как цель терапии для предупреждения стенозов рестенозов. В приведенных выше случаях ГАГ глико-

## ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ

	ПОЛИМЕРЫ	СОПОЛИМЕРЫ
ГЛЮКОЗ-АМИНОГЛИКАНЫ	$\left[ - 4 \text{ GlcA}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1- \right]_n$ <p style="text-align: center;">отсутствует O-сульфатирование</p>	$\left[ - 4 \left  \begin{array}{l} \text{GlcA}(\beta 1) \\ \text{IdoA}(\alpha 1) \end{array} \right  - 4 \text{GlcNAc}(\alpha 1- \right]_n$ <p style="text-align: center;">(2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)      (3-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</p>
	ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА	ГЕПАРИН/ГЕПАРАНСУЛЬФАТ
ГАЛАКТОЗ-АМИНОГЛИКАНЫ	$\left[ - 4 \text{ GlcA}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1- \right]_n$ <p style="text-align: center;">(2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)      (4-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</p>	$\left[ - 4 \left  \begin{array}{l} \text{GlcA}(\beta 1) \\ \text{IdoA}(\alpha 1) \end{array} \right  - 4 \text{GalNAc}(\beta 1- \right]_n$ <p style="text-align: center;">(2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)      (4-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</p>
	ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ	ДЕРМАТАНСУЛЬФАТ

**Рис. 1.** Условное представление структурных звеньев гликозаминогликановых цепей полимерной и сополимерной природы. Цифры в скобках перед знаком сульфогрупп обозначают возможные позиции сульфатирования в остатках гексуроновых кислот или N-ацетил-гексуроузамина. Обозначения: GlcA — глюконовая кислота, IdoA — идуриновая кислота, GlcNAc — N-ацетилглюкозамин, GalNAc — N-ацетилгалактозамин.

каликса и экстрацеллюлярного матрикса предстают компонентом иницирующего взаимодействия.

### Разрушение гликокаликса

Достаточная чувствительность гликокаликса к изменению окружающих условий позволяет ему служить одним из ранних маркеров клеточного функционирования. Так, после 60 мин ишемии в гликокаликсе эндотелия в посткапиллярных венулах крысиной брыжейки наблюдается 40 % увеличение галактозаминогликанов и 15 % повышение содержания глюкозаминогликанов (рис. 1) [23]. Реперфузия приводит к быстрой потере ГАГ эндотелиального гликокаликса [24], свидетельствуя, что его состав зависит от скорости синтеза эндотелием ГАГ и их шеддинг (отрывом/срезанием) [23]. Следует заметить, что у человека имеется весьма высокий метаболизм ГАГ, в частности гиалуроновой кислоты [25, 26]. Так, приблизительно треть имеющегося в человеческом организме гиалуронана (5 г) разрушается и замещается в течение дня, главным образом, ретикуло-эндотелиальной системой [25]. Время полужизни гиалуроновой кислоты в кровотоке составляет 2 – 5 мин [26], и через систему циркуляции оборачивается каждый день от 10 до 100 мг гиалуронана [25]. Под действием активных форм кислорода на изолированном сердце крысы [27] или морской свинки [28] после ишемии/реперфузии происходит разрушение эндотелиального гликокаликса. Такие его изменения дают вклад в механизм эндотелиальной дисфункции в постишемизированном миокарде [27, 28] и представляют раннюю ступень воспалительного каскада, связанного с реперфузионным поражением эндотелия [24].

ГАГ гликокаликса проявляют защитную функцию против увеличенного поступления атерогенных липопротеидов. С помощью электронной микроскопии гистохимически было исследовано состояние эндоте-

лия аорты человека [29]. Оказалось, что на ранних этапах атерогенеза количество гликокаликса на поверхности эндотелиального монослоя артерий увеличивается, демонстрируя компенсаторно-приспособительный ответ клетки на поступление избыточного количества атерогенных липидов. В области липидной полосы заметно резкое утолщение гликокаликса. На поздних этапах атерогенеза, с образованием фиброзной бляшки, происходит разрушение слоя гликокаликса, вплоть до его полного исчезновения. В зрелых фиброзных бляшках слой гликокаликса также существенно истончается [29]. Потеря гепарансульфата в гликокаликсе культуры эндотелия (после ее обработки гепариназой III) [30] или гиалуроновой кислоты в гликокаликсе бедренных артерий собак (после обработки гиалуронидазой) [31] ведет к снижению продуцирования NO в ответ на напряжение сдвига на поверхности эндотелия. По мнению авторов, для такого продуцирования NO гепарансульфат играет роль механорецептора, а гиалуроновая кислота выступает биомеханическим сенсором. С этим согласуется ключевое участие гепарансульфата гликокаликса эндотелия легких в воспалительном каскаде, индуцированном пептидом (полиаргинин), который вызывает реорганизацию цитоскелета с последующей барьерной дисфункцией [32]. Деградиацию гликокаликса могут стимулировать и окисленные липопротеиды низкой плотности [33]. Это способствует адгезии лейкоцитов к эндотелию, что воспроизводит условия развития атеросклероза, такие как гиперхолестеринемия и присутствие в плазме крови окисленных липопротеидов [34]. Кроме того, разрушение микроциркуляторного гликокаликса приводит к быстрому отеку миокардиальной ткани в модельных экспериментах [11]. Количество адгезированных на эндотелии лейкоцитов снижается при введении гепарина или гепарансульфата, которые могут присоединяться к люминальной поверхности [34].

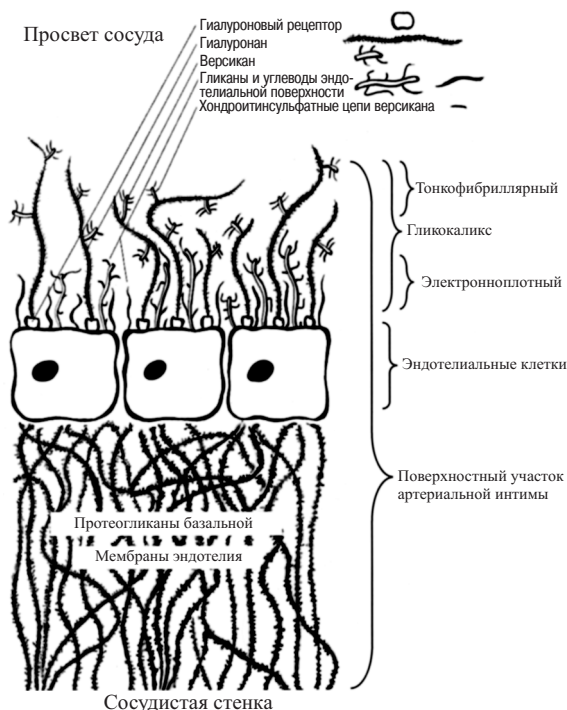


Рис. 2. Схематическое изображение поперечного среза поверхностного участка артериальной стенки.

### Реконструкция гликокаликса

Реконструкции гликокаликса способствует адгезия к клеточной поверхности гиалуронана [35, 36]. Локальное введение (через баллонный катетер) гепарина гиперхолестеринемичным кроликам обеспечивало более выраженный антистенотический эффект по сравнению с внутривенно введенным гепарином (люминальный стеноз после ангиопластики 9 и 18 %, на 28 день 30 и 45 %, в группе контроля, подвергшейся только ангиопластике, 17 и 72 % соответственно) [37]. Обнаруженный эффект свидетельствовал о возможном концентрировании ГАГ на пораженном сосудистом участке, более эффективно при локальном введении и использовании ГАГ фрагментов (соответствующие по времени стенозные показатели для низкомолекулярного гепарина составили 11 и 15 %). Используя флуоресцеин-меченый декстрансульфат (как ГАГ-аналог), внутриартериально введенный через баллонный катетер за 5 мин до (ишемия/реперфузия) поражения миокарда свиней, была прямо показана локализация этого агента в пораженном сосуде/миокарде, соответствующая снижению содержанию гепарансульфат протеогликана в результате повреждения [38]. Отмеченная локальная направленная цитопротекция декстрансульфатом указывала на важность восстановления поврежденного протеогликанового слоя, что обеспечивает достоверное снижение размера инфаркта миокарда у животных. Восстановление микроциркуляторного гликокаликса у хомяков (после его деструкции гиалуронидазой) достигается инфузией смеси гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата [39]. Использование же названных ГАГ по отдельности не давало эффекта реконструкции гликокаликса. Учитывая способ-

ность гиалуронана создавать матрицы со свойствами молекулярного сита, он может играть важную роль в регуляции и установлении проницаемости апикального гликокаликса для макромолекул, а гиалуронидаза регулировать тканевую проницаемость [39].

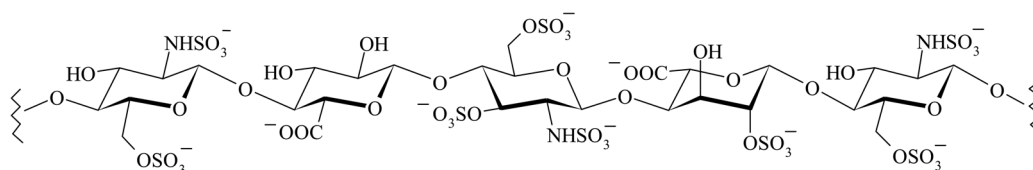
Отличие прямоцепочечной гиалуроновой кислоты/гиалуронана от других ГАГ заключается в отсутствии ковалентной пришивки/присоединения этого полимера к белковой основе, высоком размере его молекулярной массы ( $10^5 - 10^7$  Да), отсутствии сульфатирования его молекул и в осуществлении синтеза не в аппарате Гольджи [25, 26, 40], а скорее на внутренней стороне плазматической мембраны. Как и другие ГАГ, гиалуроновая кислота одновременно выполняет в организме структурные и регуляторные функции. Первые связаны с взаимодействием с другими ГАГ экстрацеллюлярного матрикса важными для структуры и сборки некоторых тканей и проявляемые в сосудистой стенке (рис. 2). Вторые заключаются в связывании воды и солей, взаимодействии с другими биомолекулами (белками, липидами, липопротеидами, рецепторами клеточной поверхности) для влияния на внутриклеточную передачу сигнала или интернализацию гиалуроновой кислоты [25, 40]. Гидратированные цепи гиалуронана способствуют организации пути для клеточного движения [40], а разрушение эндотелиального гликокаликса капилляров ведет к быстрому отеку миокардиальной ткани [11]. Гидратированное состояние самой гиалуроновой кислоты облегчает диффузию белков и электролитов. Высокие количества гиалуронана характерны для эмбриогенеза и ранозаживления [25].

На поздних стадиях ранозаживления в полностью дифференцированных тканях (таких как костная и хрящевая) появляются отложения другого ГАГ — хондроитинсульфата [26]. В эволюции многоклеточных организмов хондроитинсульфат появился прежде гиалуроновой кислоты. Одно из возможных объяснений этого среди многих заключается в том, что позднее появление гиалуроновой кислоты в эволюции может совпадать с потребностью обособления полипотентных стволовых клеток, которые остаются недифференцированными на протяжении жизни организма. Благодаря этому обеспечивается резервуар недифференцированных клеток для более позднего восстановления и распространения, чтобы заполнить дефекты, для ранозаживления и как особый способ адаптивной репарации [26]. Организм без гиалуроновой кислоты не может иметь такой компенсаторный механизм, возможно, потому, что все его клетки остаются полипотентными. Организм же более высокого положения по эволюционной шкале построен, в основном, дифференцированными клетками. Запас плюропотентных клеток может поддерживаться в плоде или в виде стволовых клеток окружением, богатым гиалуроновой кислотой, используя такие клетки из резерва организма. Альтернативно гиалуроновая кислота может способствовать миграции плодных клеток на заметные расстояния, в чем нет необходимости у более прими-

## Виды гепарин-связывающих центров в белках

<b>XBVXBX</b>	<b>X</b> – гидропатическая кислота, чаще Ser или Gly
и	
<b>XBVBXXBX</b>	<b>B</b> – основная аминокислота, в основном, Arg или Lys

### Гепариновый пентасахарид



**Рис. 3.** Формализованный состав и структура центров белок-гликозаминогликановых взаимодействий (на примере гепарина). Пояснения см. в тексте.

тивных организмов [26]. В целом, способность синтезировать гиалуронан является недавней инновацией в эволюции многоклеточных организмов [41].

Гиалуронан представлен в экстрацеллюлярном матриксе, на клеточной поверхности и внутри клеток [25, 26, 41]. В тканях он является важным структурным компонентом внеклеточного матрикса, как например в хрящах. Для образования клеточной оболочки гиалуронан присоединяется к клеточной поверхности через его рецепторы (CD44, RHAMM/receptor for hyaluronan-mediated motility/, TSG-6/tumor necrosis factor-stimulated gene 6/) или другие гиалуронан-связывающие белки (гиалоадгерины) и гиалуронан синтазы [41]. Большинство из них содержит один или два участка связывающего модуля (известного как протеогликановый тандемный повтор/proteoglycan tandem repeat (PTR)/), состоящего из 2 альфа-спиралей и 2 тройных антипараллельных  $\beta$ -слоев, расположенных вокруг большого гидрофобного ядра, что отвечает С-типу лектинового модуля [25]. Участком для гиалуронанового связывания может быть мотив VX<sub>7</sub>V, где V — остаток основной, а X — любой аминокислоты, которая не является отрицательно заряженной. Рецепторное связывание гиалуронана может ассоциироваться с внутриклеточным сигналингом [25, 41] (который здесь не рассматривается) и с его заякориванием на поверхности клетки для образования ее полисахаридной оболочки. Удержание гиалуроновой кислоты способствует захвату и встраиванию внеклеточных связывающих гиалуронан белков (рис. 2) (как хондроитинсульфат протеогликанов разной локализации версикан, агрекан, бревикан, нейрокан) в непосредственное окружение клетки [25]. Сывороточный гиалоадгерин интер- $\alpha$ -трипсиновый ингибитор (I $\alpha$ 1) и TSG-6 образуют прочный комплекс, который может способствовать сшивке молекул гиалуронана, чтобы стабилизировать образование матрикса. В общем, способность протеогликанов взаимодействовать с компонентами гликокаликса и внеклеточного матрикса (гиалуронаном, гликолипидами и гликобелками, нерастворимыми фиб-

риллярными белками и ассоциированными белками плазмы) дает им возможность регулировать биомеханические свойства сосудов, формируя гелевую оболочку клеточного микроокружения.

### Связывание низкомолекулярных веществ

К белковой основе/кору протеогликанов ковалентно присоединены линейные ГАГ цепи разной степени сульфатирования. Действительно, анализ протеогликанового состава версикана нормальной и атеросклеротически пораженной стенки артерий обнаружил его гетерогенность [42]. Отрицательный заряд сульфогрупп влияет на участие ионов, пространственного осмотического градиента, объема гидратации в функционировании фибриллярной сети, внеклеточного гелевого матрикса как биологического сита в процессах клеточной пролиферации, адгезии, подвижности, коагуляции крови. В норме интерстиций живых тканей поддерживается в относительно дегидратированном состоянии. Механизм этой поддержки сложен и зависит от ГАГ. В патологических условиях (воспаление и т. п.) возбужденные ткани (включая артериальные) разбухают, препятствуя тканевому потоку/перфузии, затрудняя проникновение нутриентов и лекарственных средств. Ферментативное удаление из внеклеточной гелевой оболочки ГАГ снижает отмеченное набухание тканей и способствует, в результате такого частичного дегидратирования, регуляции скорости важных биологических реакций. В целом, гидратационный объем гелевого матрикса поддерживается балансом сил, включающих эластичность различных полимерных компонентов, их химическую аффинность, фиксированный заряд, осмотические взаимодействия ионизованного растворителя.

Предположительно, макромолекулярные взаимодействия, определяющие развитие атерогенеза, должны быть направлены, в частности, на относительно дегидратационное состояние, превалирующее в норме *in vivo*. Поскольку эти силы внутренне сопряжены с механическими и структурными факторами, соответствующими количеству и пространственному распре-

делению ГАГ в интактных тканях, то изменение в составе и распределении ГАГ будут влиять на объем гидратации. Действительно, гистологически обнаруженные нарушения в атеросклеротических тканях, такие как диффузионное утолщение и дезорганизация фибриллярных элементов в интиме, указывают на дисрегуляцию локального водного гомеостаза. Было найдено, что в сравнении с нормальной у атеросклеротически пораженной (IV тип поражения согласно классификации Американской Ассоциации Сердца) ткани аорты наблюдается уменьшение степени сульфатирования хондроитинсульфата [42]. Из-за этого снижался антикоагулянтный резерв экстрацеллюлярного матрикса, так как связывание антитромбина с хондроитинсульфатом затруднялось необходимостью дегидратации большого количества молекул воды с белковой поверхности (в реакции последовательного ингибирования фактора Ха). Конечно, пространственное расположение ГАГ цепей может заполнять экстрацеллюлярный матрикс и способствовать белок-белковому взаимодействию простым сокращением эффективного объема, доступного для диффузии. С другой стороны, варьирование степени сульфатирования ГАГ может влиять на баланс воды в экстрацеллюлярном матриксе изменением количества растворителя, способного обильно гидратировать белковую поверхность [43]. Так косольвент (дополнительно растворенное в системе вещество) принуждает белки к частичной дегидратации (благодаря собственной гидратации) и сдвигает равновесие в сторону меньшего содержания связанной воды в гидратационном слое белков. Это является следствием термодинамической стабильности и связи между связыванием воды и образованием белковых комплексов, которое и направляет равновесие к кажущемуся повышению аффинности белок-белкового взаимодействия [43]. Вместе с тем разработка новых антикоагулянтов на основе пентасахаридов из гепариновой последовательности показала, что увеличение степени сульфатирования последней ведет к усилению ее аффинности к антитромбину (без учета влияния гидратации) и повышению времени полужизни в кровотоке [44]. Вероятно, для надежного выяснения роли переноса воды в рассматриваемой ситуации необходимы исследования других реакций коагуляционного каскада [43] и пара- и трансцеллюлярного (посредством аквапоринов) транспорта воды [19].

### **Связывание высокомолекулярных веществ**

ГАГ предстают антеннами клеточной поверхности для связывания с хемокинами [45]. Повышение локальной концентрации хемокинов на клетке вблизи G-белок связанного рецептора способствует их взаимодействию, когда хемокин может переходить с поверхностного гликозаминогликана на рецептор. С другой стороны, комплекс хемокина с растворимым ГАГ не способен связываться с рецептором. Так, ГАГ могут регулировать взаимодействие рецепторов с хемокинами, концентрируя последние на поверхности клеток и создавая конкуренцию за хемокин между клеточным рецептором и растворимым ГАГ [45]. Образованием

депо макромолекулярных лигандов, связанных с поверхностно-клеточными ГАГ, удается не только регулировать биологическую активность, но и защищать лиганды от инактивации, например, предотвращая неферментативное гликозилирование основного фактора роста фибробластов благодаря связыванию с гепарансульфатом (но не с хондроитинсульфатом) [46]. Связывание с белками позволяет протеогликанам разнообразно участвовать в состоянии нормы в клеточном и тканевом развитии.

При патофизиологических условиях хондроитинсульфат/гепарансульфат протеогликанов могут инициировать повышенное связывание липопротеидов низкой плотности (в интактном и окисленном виде) и образовывать внеклеточные преатеромные липидные отложения в интиме и внутри меди. Такое докирование липопротеидов низкой плотности может сопровождаться образованием тройного комплекса протеогликан/липопротеид/ $Ca^{++}$ , ведущим к кальцификации артерий [47]. Отмечалось, что хондроитинсульфат протеогликан макрофагов связывает окисленные липопротеиды низкой плотности. В условиях окислительного стресса содержание этого протеогликана на макрофагах увеличивается, что наряду с захватом липопротеидов низкой плотности может ускорять развитие атеросклероза [48]. Кроме того, экзогенно введенные гепарансульфат или хондроитинсульфат могут встраиваться в клеточное окружение, увеличивая захват окисленных липопротеидов низкой плотности [49]. Было показано, что ГАГ (гепарансульфат, хондроитинсульфат) ускоряют активацию плазминогена урокиназой, влияя на  $k_{КАТ}$ , а липопротеиды низкой плотности или липопротеид Lp(a) ингибируют их эффект [50]. Это подчеркивает многоплановость опосредованной регуляторной функции ГАГ.

Таким образом, ГАГ, представленные в экстрацеллюлярном матриксе, интерстиции, гликокаликсе, участвуют в связывании биомолекул разного типа, действуя на них аллостерически и мостиковым или подложковым образом. Предполагалось, что в зависимости от структуры и состава протеогликанов (последовательность сахара, вид белка) они могут индивидуализировать свои функции в организме [51]. Конечно, это потребовало широкого фронта исследований.

### **Центры взаимодействия на гликозаминогликанах**

Результатом многочисленных исследований стало обнаружение уникальной пентасахаридной последовательности (рис. 3) в гепарине [52], которая опосредует низкоаффинное связывание ГАГ с антитромбином. Происходящие при этом с последним конформационные изменения усиливают их связывание. Оно способствует образованию тройного комплекса антитромбин-гепарин-протеаза (тромбин или фактор Ха), в котором осуществляется возвращение к низкоаффинному связыванию углевода с белком, опосредуя специфическое взаимодействие ингибитора с ферментом на углеводной подложке/матрице. Полученные данные позволяют использовать синтетические аналоги антитромбин-связывающей пентасахаридной последовательности гепарина в качестве антикоагулянтов для ле-

чения венозного тромбоемболизма [44]. Гепарин-связывающие центры белков характеризуются наличием кластеров положительно заряженных основных аминокислот (обозначаемых как В: аргинин или лизин), которые образуют ионные пары с пространственно ориентированными отрицательно заряженными сульфогруппами и карбоксильными группами ГАГ цепи. Аминокислотные последовательности гепарин-связывающих центров были определены в витронектине, аполипопротеинах В и Е, четвертом тромбоцитарном факторе [52]. Они предстают в виде 2 мотивов: ХВВХВХ и ХВВВХВХ, где В — остаток основной, а Х — отрицательно незаряженной аминокислоты, наиболее часто серин или глицин (рис. 3). Первый мотив организуется в  $\beta$ -слой, а второй сворачивается в  $\alpha$ -спираль. Из 2  $\alpha$ -спиральных и 2 антипараллельных  $\beta$ -слоев вокруг гидрофобного ядра состоит лектиновый модуль С-типа, осуществляющий связывание гиалуронана [25]. Хотя один связывающий модуль достаточен для взаимодействия с гиалуронатом (TSG-6), некоторые белки имеют их по два (белки в протеогликах агрекане, версикане, нейрокане). Рецептор гиалуронат-опосредованной подвижности (RHAMM) имеет другой мотив связывания гиалуронана  $\text{VX}_7\text{V}$  [25]. Отмечалось, что гексасахаридная последовательность дерматансульфата может способствовать связыванию гепаринового кофактора II и аллостерическим образом вызывать затем селективную инактивацию тромбина [53]. Ингибированию поддается тромбин в растворе и связанный с фибрином или поверхностью пораженного сосуда. Приведенные результаты избирательного взаимодействия белков с ГАГ выявляют роль ГАГ-связывающих доменов в сосудистой биологии и перспективы фармакологического контроля событий, протекающих в сосудистой стенке.

### Эффекты целых и фрагментированных гликозаминогликанов

Издавна были известны антикоагулянтные свойства ГАГ, проявляемые ими в поли- и олигомерном виде, начиная с некоторого порогового значения молекулярной массы производного [53, 54]. Интересно отметить, что биологические эффекты гиалуронана заметно варьируются в зависимости от его молекулярной массы. Так, высокомолекулярные гиалуроновые полисахариды, будучи молекулами пространственного наполнения и гидратации тканей, являются антиангиогенными, противовоспалительными и иммуносупрессивными [26]. Фрагменты гиалуронана с молекулярной массой 20 кДа уже стимулируют синтез воспалительных цитокинов. Меньшие фрагменты (6 – 20 кДа) гиалуроновой кислоты оказывают ангиогенными, провоспалительными и иммуностимулирующими [25, 26]. Гиалуроновые фрагменты молекулярной массы 200 кДа улучшают *in vitro* выживание эозинофилов периферической крови, а гиалуроновая кислота (молекулярной массой от 3000 до 6000 кДа) имеет существенно меньший эффект [25]. Фрагменты гиалуронана могут обладать биологической активностью отличной от полимерной формы. Низко-, но не высокомолекулярный гиалуронан стимулирует продукцию металло-

эластазы в МН-S клетках и экспрессию индуцибельной NO синтазы в эндотелиальных и купферовских клетках печени крыс [25]. Связывание высокомолекулярной гиалуроновой кислоты к CD44 ингибируется ее олигосахаридными фрагментами, состоящими из 6 – 18 сахаров. Это подчеркивает факт, что именно гексамер гиалуронана занимает лимитирующий участок связывающего центра белка. С ростом длины цепи гиалуронана (20 – 30 сахаров) ингибирование повышается [25]. Механизм зависимости эффектов от молекулярной массы гиалуроновых производных пока неизвестен. Необходимо отметить особо зависимость экспериментальных данных от количества используемого гиалуронана [41], применяемых лотов гиалуроновой кислоты (различающихся от разных производителей) [25]. Поэтому следует весьма внимательно и осторожно подходить к интерпретации таких данных, включая некоторые контрольные эксперименты с гиалуронатом.

### Гликозаминогликаны в патофизиологических процессах

В состоянии нормы в стенке кровеносных сосудов гиалуронан взаимодействует с версиканом с образованием высокомолекулярных стабильных агрегатов [9]. Они заполняют пространство экстрацеллюлярного матрикса и создают обратимо сжимаемый слой, способный к набуханию, который поджимается коллагеном и эластическими волокнами. Ранние стадии атерогенеза у человека оказываются малодоступными для биохимического изучения, поскольку они редко определяются и болезнь диагностируется, когда уже проявляются клинические симптомы. Поэтому такая информация собирается, в основном, из данных экспериментальных исследований с животными. При этом следует помнить о видовых отличиях протеогликанового состава. Сосудистая стенка мыши, например, богата гепарансульфат протеогликами, а человека — хондроитинсульфат и дерматансульфат протеогликами [9]. Причины этого неясны, но могут определять фундаментальные видовые отличия роли экстрацеллюлярного матрикса в атерогенезе человека и животных. Повреждение сосудов баллонным катетером у животных приводит к резкому повышению содержания гиалуронана [55]. Его особенно много вокруг пролиферирующих и мигрирующих артериальных гладкомышечных клеток, и растет содержание ассоциирующихся с ним версикана, TSG-6, CD44. Ранее интимальное утолщение сосудистой стенки также характеризуется заметным наличием в ней версикана [17]. Он накапливается в стенке сосудов, склонных к атеросклеротическому поражению, и у человека [9]. Гиалуронан и версикан представлены в местах удержания воспалительных клеток, что рассматривается сейчас как общая часть инициации атерогенеза [56]. Проникновение лейкоцитов из крови в сосудистую стенку опосредуется гиалуронатом, связанным с эндотелием через CD44 или RHAMM, и CD44 на поверхности лейкоцитов [52]. Таким образом, в начальной стадии воспаления как решающего этапа атерогенеза гиалуронан выступает субстратом для воспалительных клеток.

В ранней стадии атерогенеза значимым этапом предстает субэндотелиальное удержание липопротеидов низкой плотности, содержащих апо-В-100, протеогликанов [57]. Связанные с протеогликаном (версиканом, бигликаном) липопротеиды оказываются более чувствительными к атерогенной модификации. По-видимому, имеется много центров связывания между этими макромолекулами, но их точная структура пока не определена [9]. Длина ГАГ цепи оказывается детерминантой связывания с липопротеидами, поскольку несколько липидных частиц могут связываться с одной цепью ГАГ [58]. Хондроитин-6-сульфат более прочно захватывает липопротеиды низкой плотности, чем хондроитин-4-сульфат. Комплексы версикана с липопротеидами низкой плотности быстро захватываются макрофагами и артериальными гладкомышечными клетками посредством рецепторов, что приводит к клеточному накоплению липидов и образованию пенистых клеток, характерных для богатых липидами атеросклеротических бляшек. Так версикан может играть основную роль как во внеклеточном, так и во внутриклеточном удержании/захвате липопротеинов при атерогенезе [9]. Гиалуронан связывается с фосфолипидами посредством гидрофобных взаимодействий и очаги сосудистого поражения, богатые липидами, содержат обычно и высокий уровень гиалуроновой кислоты [55]. Это способствует размягчению и набуханию тканей, что ослабляет стабильность атеросклеротической бляшки и располагает ее к разрыву. Присутствие версикана и гиалуронана в составе зрелых атеросклеротических бляшек предполагает их роль в развивающемся тромбозе [17]. Версикан-гиалуроновые комплексы могут служить вспомогательными лигандами для тромбоцитов и их накопления после разрыва шляпки атеросклеротической бляшки [9].

ГАГ регулируют содержание воды в местах атеросклеротического поражения сосудов [42]. Гиалуронан и версикан, избыточно представленные в рестенозированных участках сосудов, образуют высокомолекулярные гидрофильные комплексы. Они обильно гидратируются и вызывают тканевый отек [9, 55]. Благодаря этому, в частности, происходит быстрое распространение рестенозного поражения. Разрушение гиалуронан-версикановых комплексов приводит к изгнанию/удалению молекул воды и сжатию ткани с сокращением внутреннего артериального диаметра [55]. Поскольку гиалуронан влияет как на гиперпластическую, так и ремоделирующую стадию развития рестеноза [9], следует осмотрительно подходить к моменту/фазе его коррекции [22]. Последнее может определять направленность действия применяемого фармакологического агента и результат такого терапевтического вмешательства. Миокардиальный инфаркт сопровождается отеком миокарда, в развитии которого заметную роль играет гиалуронан [9]. Его удаление, в результате применения гиалуронидазы, снижает размер поражения и способствует улучшению тканевого потока для лекарственных средств и нутриентов [7]. Отек миокарда, сопровождаемый заметными потерями жидкости в микроциркуляции, ведет к сердечной

дисфункции после ишемии, гипертонии, сепсиса, хирургической реваскуляризации. Такая ситуация подчеркивает важность адекватного восстановления кровотока в “макро”- и “микро”циркуляторной системе [4, 7, 9] селективным терапевтическим воздействием на гликокаликс (гиалуронан, версикан). Изменение экстрацеллюлярного матрикса, начатое накоплением версикана и гиалуронана, приводит к отсутствию в нем эластических волокон. Нарушение синтеза эластина в атеросклеротических и рестенозных очагах вызывает обструктивные сосудистые патологии [9].

Экстрацеллюлярный матрикс, богатый гиалуронаном и версиканом, способствует изменению формы клеток и их подготовки к пролиферации и миграции [9]. Блокирование образования версикан-гиалуронового клеточного окружения или антителами против гиалуроновых рецепторов, или экзогенно введенным гиалуронаном [55] и его короткими олигосахаридами [9] тормозит накопление моноцитов и лимфоцитов, пролиферацию артериальных гладкомышечных клеток в очагах поражения и существенно снижает остроту экспериментального атеросклероза. Уменьшение неоинтимального образования в пораженной баллонным катетированием аорте крыс достоверно наблюдалось после введения небольших фрагментов гиалуронана (состоящих из 4 – 16 сахаридов) [59]. Такие данные обращают внимание на фрагменты гиалуронана (с надежным профилем безопасности [60, 61]) как на привлекательный объект для предупреждения рестенозов после ангиопластики. Заманчиво их эндогенное образование в месте поражения в результате локального введения экзогенной гиалуронидазы. Полагают, что избыточное появление версикана, гиалуронана в сосудистой интиме способствует развитию поражения, тогда как деструкция ГАГ компоненты может быть частью регрессии сосудистых нарушений.

Следует отметить влияние гиалуронана на клеточное поведение [55]. Это обусловлено уникальными гидродинамическими свойствами этого ГАГ, его взаимодействием с другими макромолекулами (гиалоадгерином) для сборки клеточной оболочки и внеклеточного матрикса и его влиянием на клеточный сигналинг. Гидратируя ткани и регулируя их набухание, гиалуронан создает тягучую жидкую матрицу для митоза и миграции клеток. Экстрацеллюлярный матрикс опухолей оказался обогащенным гиалуронаном и версиканом. Клетки опухолей (карциномы молочной железы, желудка, толстого кишечника) сами, в отличие от нормального эпителия, экспрессируют гиалуронан. Эпителиальные опухоли окружает соединительно-тканная строма, богатая гиалуронаном. Такая матрица способствует делению клеток, а ее замена на гиалуроновые олигосахариды ингибирует его. Показано, что сверхэкспрессирование гиалуронан синтаз вызывает рост фибросаркомы и карциномы простаты, метастазирование карциномы молочной железы *in vivo* [55]. Деградация гиалуронана гиалуронидазой повышает доступность опухолевых клеток антираковым лекарствам и снижает тургор злокачественной ткани [26]. Устранение гиалуронидазной активности являет-



ся важным этапом в многостадийном развитии некоторых типов рака. Порой считают потерю гиалуронидазы ярким опухолевым маркером. Однако клинические данные бывают противоречивы, обнаруживая, что как уровень гиалуронидазы, так и экспрессия гиалуронана коррелируют с развитием опухоли. Возможно, это отражает общий высокий метаболизм гиалуроновой кислоты при этом. Отделение эндотелиальных и околоопухолевых клеток стромы от самих специфических раковых клеток и анализ их индивидуальных путей катаболизма гиалуронана может помочь согласованию данных и поиску эффективных средств терапии [26, 55].

### Регуляция состояния околоклеточной оболочки

Модельная коррекция углеводной оболочки поверхности сосудистой стенки осуществлялась изменением скорости потока (варьирование напряжения сдвига на эндотелиальный монослой) [20, 24, 62], воздействием на биосинтез ГАГ [25, 40, 41], обеспечением конкурентных взаимодействий с составными частями околоклеточного матрикса, используя антитела [55], экзогенные ГАГ [34, 39, 49, 55], их олигосахаридные фрагменты [8, 35, 36, 59], углеводные аналоги [38], применяя ферментативную деструкцию ГАГ гликокаликса и экстрацеллюлярного матрикса [30 – 32, 39, 48]. Последний подход, органично связанный с ГАГ катаболизмом, включает использование гепариназы [30, 32, 36, 48], хондроитиназы [63], гиалуронидазы [25, 26, 31, 39, 41]. Применение гепариназы и хондроитиназы, имеющих бактериальное происхождение, носит выраженный исследовательский характер [30, 32, 36, 48, 63], тогда как гиалуронидаза используется давно в качестве медицинского препарата и клинически тестировалась для локального и системного введения [7]. В соответствии с особенностями и продуктами катализа гиалуронидазы подразделяются на 3 класса [25]. К первому относятся бактериальные гиалуронидазы (ЕС 4.2.99.1), функционирующие как  $\beta$ -элиминазы, и основным конечным продуктом которых оказываются дисахариды. Второй класс включает эндо- $\beta$ -гиауроноидазы (ЕС 3.2.1.36), расщепляющие в гиалуроновой кислоте  $\beta(1-3)$ -гликозидную связь с образованием в качестве доминирующего конечного продукта тетра- и гексасахаридов. Эти гиалуронидазы представлены в пиявках, нематодах, ракообразных. Гиалуронидазы млекопитающих (ЕС 3.2.1.35) составляют третий класс, деструктирующий гиалуроновую кислоту с разрывом  $\beta(1-4)$ -гликозидной связи и с основным образованием тетра- и гексасахаридов как конечного продукта реакции. Недостаточная абсолютная субстратная специфичность позволяет таким гиалуронидазам переваривать хондроитин и хондроитинсульфат. Особенностью этого класса гиалуронидаз является способность катализировать реакции трансгликозилирования [64, 65], обнаруженные *in vitro*. В результате этого образуются сшитые углеводные участки не только внутри гиалуроновых цепей, но и в гибридных гиалуронан-хондроитинсульфатных макромолекулах. Встречается ли такое превращение *in vivo* еще предстоит выяснить. В соответствии с гомологией

аминокислотных последовательностей гиалуронидазы подразделяют на 2 семейства: гиалуронидазы про- и эукариот [66, 67]. Геном человека содержит 6 гиалуронидазоподобных генов, собранных в хромосоме 3p21.3 (HYAL 1, HYAL 2, HYAL 3) и 7q31.3 (HYAL 4, RHyal 1, SPAM 1) [26, 67]. Генетические нарушения у человека, связанные с отсутствием активности гиалуронидазы 1, вызывают мукополисахаридоз IX, проявляющийся в повышенном уровне циркулирующей гиалуроновой кислоты (на порядок выше нормального).

Зрелые гиалуронидазы подвергаются 2 видам дополнительного процессинга: или 2 реакции эндопротеолитического расщепления, или протеолитическое отщепление от глюкофосфатидилинозитольного якоря на клеточной мембране. Подвергающаяся воздействию первого типа гиалуронидаза 1 существует в 2 молекулярных формах 54 и 49 кДа. Обе появляются в моче, а 54 кДа форма гиалуронидазы 1 является единственной, представленной в плазме [25]. Тестикулярная гиалуронидаза человека и быка оказалась гомологична гиалуронидазе из яда пчел. Они имеют сходные свойства и механизм действия, проявляя себя как биокатализаторы, необходимые для проникновения сперматозоидов через насыщенные гиалуроновой кислотой массы, окружающие яйцеклетку при оплодотворении [68, 69]. Пространственная структура гиалуронидазы из яда пчел была получена с использованием кристаллографического анализа [70]. Эта структура пригодна для моделирования строения тестикулярных гиалуронидаз, имеющих с ней достаточную долю гомологии [26, 41]. Найденная с разрешением 1,6 Å структура соответствует классической ТИМ-бочке ( $\beta/\alpha$ -triose phosphate isomerase barrel /TIM/, триозофосфатизомеразная бочка), состоящей, правда, только из семи, а не из восьми слоев и имеющей длинный желобок для субстратного связывания (перпендикулярный С-концу оси ТИМ-бочки). В активном центре остаток Glu 113 действует как донор протонов, а N-ацильная группа субстрата как нуклеофил [67].

В качестве медицинского препарата местного, наружного и локального действия используется бычья тестикулярная гиалуронидаза и гиалуронидаза из яда пчел [7, 68, 69, 71]. Они проявляют рН-оптимум эндогликозидазной активности в кислой среде (рН 3,5 – 6,0) [72, 73], а трансгликозилазной в слабощелочной (рН 7,0 – 7,5) [64, 65, 74]. С ростом величины ионной силы эндогликозидазная активность увеличивается, а трансгликозилазная падает [65, 74]. Для проявления обоих видов активности необходимы олигосахариды, состоящие из 6 – 12 мономерных звеньев [65, 74]. Высокая потребность организма в значительном уровне гиалуроновой кислоты обеспечивает наличие многочисленных ингибиторов гиалуронидазы [75, 76]. Возможно, что разнообразие и повсеместность гиалуронидазных ингибиторов даже выше, чем самих гиалуронидаз [26, 76].

Разработка медицинских препаратов гиалуронидазы подразумевает существенное снижение их ингибируемости и возможность регулирования их активности для управления вызываемыми эффектами. Было

обнаружено, что постепенная химическая модификация поверхностных аминокрупп бычьей тестикулярной гиалуронидазы придает ей заметную резистентность к гепариновому ингибированию [77]. Ковалентное присоединение к гиалуронидазе декстрана позволяет получить ее производные со стабилизированной эндогликозидазной активностью, перспективные для терапии сосудистых [78], легочных [79], онкологических [80] поражений. Отмечалось регуляторное влияние на гиалуронидазное эндогликозидирование разных форм ГАГ [81]. Развитие этого подхода направлено на выяснение молекулярно-кинетического механизма функционирования гиалуронидазы в ГАГ микроокружении. На основе таких данных базируется разработка производных, влияющих на углеводную компоненту биосистем. Актуальность подобных средств подчеркивается необходимостью точного и дозированного гликозилирования рекомбинантных белков для эффективного медицинского применения, улучшением при этом их фармакокинетического профиля (хотя патологический дефицит гликозилирования достаточно редко встречается при заболеваниях человека) [82]. Последнее подчеркивает важность контролируемой деструкции ГАГ ферментными производными, полученными методом химического и биологического синтеза, для смежной терапии при патологиях сердечно-сосудистой системы [83, 84].

Представленные данные свидетельствуют о многоплановой роли ГАГ компоненты гликокаликса, экстрацеллюлярного матрикса, интерстиция в организме. Имеющиеся сведения не позволяют видеть в ней только гидратированную подложку для клеточного удержания и перемещения. Важно ее участие в построении тканей, обеспечении существования околочелюточной оболочки, функционирование в процессах передачи сигнала в клетку. Такая ситуация обуславливает развитие ГАГ исследований по многим направлениям с участием специалистов самых разных областей знания.

Обнаружение молекулярных партнеров, взаимодействующих с ГАГ, — гиалоадгеринов, синтаз, гиалуронидаз, других ферментов и ингибиторов их метаболизма расширяет фронт изучения и увеличивает число его объектов. Значимость таких исследований подчеркивается влиянием ГАГ на процессы морфогенеза, эмбриогенеза, интерстициального гомеостаза и клеточного поведения.

Последнее связано, в том числе, и с развитием патофизиологических процессов, приводящих к появлению атеросклероза и рака. Понимание закономерностей этих патологий способствует пониманию их протекания, вызывающих их причин, способов коррекции неблагоприятного развития молекулярно-биологических событий. Продемонстрирована заметная роль версикана в сосудистом атерогенезе, гиалуронана — в развитии ракового поражения, гиалуронан-версикановых комплексов — в появлении раннего интимального утолщения. Исследовательское внимание привлекают процессы воспаления, ранозаживления, эмбриогенеза. Регуляция ГАГ взаимодействий предстает формирующейся сейчас, быстро расширяющейся, привлекающей

сей современные и совершенно новые методы и подходы областью гликобиологического и биохимического изучения, обещающего заметные и прорывные открытия в обозримом будущем.

Настоящая работа выполнена при частичной финансовой поддержке Росздрава и Росмедтехнологий, а также грантов РФФИ 06-04-48058, 06-08-00011, 06-04-08002-офи и 07-04-12057-офи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. A. Maes, F. Van de Werf, J. Nuyts, et al., *Circulation*, **92**, 2072 – 2078 (1995).
2. C. M. Gibson, C. P. Cannon, S. A. Murphy, et al., *Circulation*, **101**, 125 – 130 (2000).
3. J. K. French, K. Ramanathan, J. T. Stewart, et al., *Am. Heart J.*, **145**, 508 – 514 (2003).
4. M. T. Roe, E. M. Ohman, A. C. P. Maas, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**, 9 – 18 (2001).
5. E. J. Topol, *Heart*, **83**, 122 – 126 (2000).
6. H. C. Herrmann, *Am. Heart J.*, **151**, S30 – S39 (2006).
7. S. Yusuf, *Am. J. Cardiol.*, **60**, 11A – 17A (1987).
8. L. Galiuto, A. N. DeMaria, U. del Balzo, et al., *Circulation*, **102**, 3111 – 3116 (2000).
9. T. N. Wight and M. J. Merrilees, *Circ. Res.*, **94**, 1158 – 1167 (2004).
10. V. H. Huxley and D. A. Williams, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H1177 – H1185 (2000).
11. B. M. Van den Berg, H. Vink, and J. A. Spaan, *Circ. Res.*, **92**, 592 – 594 (2003).
12. M.-C. Bourin and U. Lindahl, *Biochem. J.*, **289**, 313 – 330 (1993).
13. G. Siegel, in: *Comprehensive human physiology*, R. Greger, U. Windhorst (eds.), Vol. 1. Connective tissue: more than just a matrix for cells, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg, (1996), pp. 173 – 224.
14. A. Rapraeger, M. Jalkanen, E. Endo, et al., *J. Biol. Chem.*, **260**, 11046 – 11052 (1985).
15. K. J. Williams and I. V. Fuki, *Curr. Opin. Lipidol.*, **8**, 253 – 262 (1997).
16. S. Yla-Herttuala, H. Sumivuori, K. Karkola, et al., *Lab. Invest.*, **54**, 402 – 407 (1986).
17. F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1642 – 1648 (2002).
18. S. K. Shinjo, N. E. V. B. Prates, S. M. Oba, et al., *Atherosclerosis*, **143**, 363 – 368 (1999).
19. D. Mehta and A. B. Malik, *Physiol. Rev.*, **86**, 279 – 367 (2006).
20. R. D. Kenagy, J. W. Fischer, S. Lara, et al., *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 131 – 140 (2005).
21. I. M. Chung, H. K. Gold, S. M. Schwartz, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **40**, 2072 – 2081 (2002).
22. A. Farb, F. D. Kolodgie, J. Y. Hwang, et al., *Circulation*, **110**, 940 – 947 (2004).
23. A. W. Mulivor and H. H. Lipowsky, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, H1672 – H1680 (2004).
24. S. H. Platts, J. Linden, and B. R. Duling, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H2360 – H2367 (2003).
25. T. D. Camenisch and J. A. McDonald, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **23**, 431 – 433 (2000).
26. R. Stern, *Glycobiology*, **13**, 105R – 115R (2003).
27. E. Czarnowska and E. Karwatowska-Prokopczuk, *Basic Res. Cardiol.*, **90**, 357 – 364 (1995).
28. A. Beresewicz, E. Czarnowska, and M. Maczewski, *Molec. Cell. Biochem.*, **186**, 87 – 97 (1998).
29. E. M. Tararak and G. K. Sukhova, *Angiol. Vasc. Surgery*, **5**, 204 – 217 (1999).
30. J. A. Florian, J. R. Kosky, K. Ainslie, et al., *Circ. Res.*, **93**, 136 – 142 (2003).
31. S. Mochizuki, H. Vink, O. Hiramatsu, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H722 – H726 (2003).

32. R. O. Dull, R. Dinavahi, L. Schwartz, et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **285**, L986 – 995 (2003).
33. H. Vink, A. A. Constantinescu, and J. A. E. Spaan, *Circulation*, **101**, 1500 – 1502 (2000).
34. A. A. Constantinescu, H. Vink, and J. A. E. Spaan, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 1541 – 1547 (2003).
35. C. B. Underhill and B. P. Toole, *J. Cell Biol.*, **82**, 475 – 484 (1979).
36. S. P. Evanko, J. C. Angello, and T. N. Wight, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 1004 – 1013 (1999).
37. T. Tomaru, Y. Fujimori, T. Morita, et al., *Jpn. Circ. J.*, **60**, 981 – 992 (1996).
38. Y. Banz, O. M. Hess, S. C. Robson, et al., *Eur. Heart J.*, **26**, 2334 – 2343 (2005).
39. C. B. S. Henry and B. R. Duling, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **277**, H508 – 514 (1999).
40. B. P. Toole, *J. Clin. Invest.*, **106**, 335 – 336 (2000).
41. M. I. Tammi, A. J. Day, and E. A. Turley, *J. Biol. Chem.*, **277**, 4581 – 4584 (2002).
42. M. McGee and W. D. Wagner, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 1921 – 1927 (2003).
43. E. Di Cera, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 1713 – 1714 (2003).
44. J. I. Weitz, *Circulation*, **110**, I19 – 26 (2004).
45. G. S. V. Kuschert, F. Coulin, C. A. Power, et al., *Biochemistry*, **38**, 12959 – 12968 (1999).
46. N. N. Nissen, R. Shankar, R. L. Gamelli, et al., *Biochem. J.*, **338**, 637 – 642 (1999).
47. G. Siegel, M. Malmsten, D. Klussendorf, and W. Leonhardt, *Atherosclerosis*, **144**, 59 – 67 (1999).
48. M. Kaplan and M. Aviram, *Atherosclerosis*, **149**, 5 – 17 (2000).
49. M. Kaplan, K. J. Williams, H. Mandel, and M. Aviram, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 542 – 553 (1998).
50. J. M. Edelberg, M. Weissler, and S. V. Pizzo, *Biochem. J.*, **276**, 785 – 791 (1991).
51. G. David, A. Danneels, J. Duerr, et al., *Atherosclerosis*, **118**, S57 – 67 (1995).
52. E. M. Munoz and R. J. Linhardt, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1549 – 1557 (2004).
53. G. G. Nenci, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, **32**, 303 – 307 (2002).
54. P. Bianchini, *Semin. Thromb. Hemost.*, **15**, 365 – 369 (1989).
55. B. P. Toole, T. N. Wight, and M. I. Tammi, *J. Biol. Chem.*, **277**, 4593 – 4596 (2002).
56. N. R. Madamanchi, Z. S. Hakim, and M. S. Runge, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 254 – 267 (2005).
57. K. Skalen, M. Gustafsson, E. K. Rydberg, et al., *Nature*, **417**, 750 – 754 (2002).
58. S. R. Srinivasan, J. H. Xu, P. Vijayagopal, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1168**, 158 – 166 (1993).
59. A. Chajara, M. Raoudi, B. Delpuch, and H. Levesque, *Atherosclerosis*, **171**, 15 – 19 (2003).
60. D. O. Clegg, D. J. Reda, C. L. Harris, et al., *N. Engl. J. Med.*, **354**, 795 – 808 (2006).
61. D. T. Felson, *N. Engl. J. Med.*, **354**, 841 – 848 (2006).
62. R. D. Kenagy, J. W. Fischer, M. G. Davies, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 400 – 404 (2002).
63. J. Filmus, W. Shi, Z. M. Wong, and M. J. Wong, *Biochem. J.*, **311**, 561 – 565 (1995).
64. J. A. Cramer, L. C. Bailey, C. A. Bailey, and R. T. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 315 – 321 (1994).
65. K. Takagaki, T. Nakamura, J. Izumi, et al., *Biochemistry*, **33**, 6503 – 6507 (1994).
66. A. B. Csoka, G. I. Frost, T. Wong, and R. Stern, *FEBS Lett.*, **417**, 307 – 310 (1997).
67. A. B. Csoka, G. I. Frost, and R. Stern, *Matrix Biol.*, **20**, 499 – 508 (2001).
68. P. Primakoff, H. Hyatt, and D. G. Myles, *J. Cell Biol.*, **101**, 2239 – 2244 (1985).
69. Y. Lin, K. Mahan, W. F. Lathrop, et al., *J. Cell Biol.*, **125**, 1157 – 1163 (1994).
70. Z. Markovic-Housley, G. Miglierini, L. Soldatova, et al., *Structure Fold Des.*, **8**, 1025 – 1035 (2000).
71. G. L. Frost, T. Csoka, and R. Stern, *Trends Glycosci. Glycotecnol.*, **8**, 419 – 434, (1996).
72. I. Muckenschnabel, G. Bernhardt, T. Spruss, et al., *Cancer Lett.*, **131**, 13 – 20 (1998).
73. K. Meyer, In: The enzymes, P. D. Boyer (ed.). Vol. 5, *Hyaluronidases. Hydrolysis (sulfate esters, carboxyl esters, glycosides), hydration.* Academic Press, New York, (1971), pp. 307 – 320.
74. H. Saitoh, K. Takagaki, M. Majima, et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 3741 – 3747 (1995).
75. K. Mio, O. Carrette, H. I. Maibach, and R. Stern, *J. Biol. Chem.*, **275**, 32413 – 32421 (2000).
76. K. Mio and R. Stern, *Matrix Biol.*, **21**, 31 – 37 (2002).
77. A. V. Maksimenko, M. L. Petrova, E. G. Tischenko, and Y. V. Schechilina, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**, 33 – 38 (2001).
78. А. В. Максименко, О. Ю. Коновалова, В. Р. Бердичевский и др., *Бюлл. экп. биол. мед.*, **102**, 567 – 569 (1986).
79. О. Г. Архипова, В. В. Яглов, А. В. Максименко и др., *Бюлл. экп. биол. мед.*, **103**, 221 – 223 (1987).
80. А. В. Максименко, Ю. В. Щечилина, Е. Г. Тищенко, *Биохимия*, **66**, 563 – 572 (2001).
81. А. В. Максименко, Ю. В. Щечилина, Е. Г. Тищенко, *Биохимия*, **68**, 1055 – 1062 (2003).
82. M. L. Yarmush and S. Banta, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **5**, 349 – 381 (2003).
83. A. V. Maksimenko, *Med. Sci. Monit.*, **8**, RA13 – 2RA21 (2002).
84. M. A. Brouwer, N. Clappers, and F. W. Verheugt, *Heart*, **90**, 581 – 588 (2004).

Поступила 04.12.06

## EFFECTS OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN VASCULAR EVENTS

A. V. Maksimenko

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia;  
e-mail: alexmak@cardio.ru

Functional restoration of the myocardium upon acute cardiovascular damage was observed after reaching sufficient reperfusion of infarction-related artery and adequate microcirculation and tissue flow in the damaged area. Among others, the glycosaminoglycan component of the endothelial lining (glycocalyx, extracellular matrix, and interstitium) as well as enzymes and inhibitors of glycosaminoglycan catabolism play a regulatory role in these events. The causes and consequences of glycocalyx degradation in vascular damage and the possibilities of its reconstruction are analyzed. Special attention is focused on the ability of the carbohydrate microenvironment to regulate biomechanical parameters of blood vessels, to control tissue assembly and reparation, and to bind high- and low-molecular-weight ligands. Hydration of glycosaminoglycans determines the development of tissue edema and mediates anticoagulant activity of the extracellular matrix. It is pointed out that the regulatory function of glycosaminoglycans is fulfilled via their binding to chemokines, growth factors, proteins, and lipids. Specific structural sites have been detected on these compounds, and a relationship between the biological effects induced by glycosaminoglycans and their molecular weight is established. Participation of glycosaminoglycans in pathophysiological processes related to vascular damage is discussed, and new approaches to promising accurate and effective control over the regulation of the pericellular tegument function are suggested.