



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Obor fyziologie a imunologie živočichů



STRUKTURA A FUNKCE GLYKOKALYX ENDOTELIÁLNÍCH BUNĚK

Bakalářská práce

Michaela Macečková

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.

Brno 2011

© 2011, Michaela Macečková
Masarykova univerzita v Brně
(Všechna práva vyhrazena)

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Michaela Macečková
Název bakalářské práce:	Struktura a funkce glykokalyx endoteliálních buněk
Název bakalářské práce anglicky:	Composition and Functions of Endothelial Cell Glykokalyx
Studijní program:	Bakalářský studijní program
Studijní obor:	Fyziologie živočichů
Školitel:	Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.
Rok obhajoby:	2011
Klíčová slova v češtině:	glykokalyx, proteoglykany, glykoproteiny, propustnost cév, tloušťka glykokalyx, erythrocyty, leukocyty, mechanotransdukce, buněčná signalizace, diabetes, ischemie, reperfuze, arterioskleróza, elektronová mikroskopie, intravitální mikroskopie
Klíčová slova v angličtině:	glycocalyx, proteoglycans, glycoproteins, vascular permeability, glykokalyx thickness, erythrocyte, leukocyte, mechanotransduction, cell signaling, diabetes, ischemia, reperfusion, arteriosclerosis, electron microscopy, intravital microscopy

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Brně 8.5. 2011

.....
Michaela Macečková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Lukáši Kubalovi, Ph.D. za veškerý čas a dobré rady, jež mi věnoval.

Díky patří i celému Ústavu patofyziologie volných radikálů (BFÚ AV ČR), za vytvoření příjemného přátelského prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu, obětavost a pevné nervy.

Obsah

Abstrakt.....	- 7 -
1. ÚVOD.....	- 8 -
2. STRUKTURA A SLOŽENÍ GLYKOKALYX.....	- 10 -
2.1 Proteoglykany	- 11 -
2.2 Glykoproteiny	- 15 -
2.3 Rozpustné složky	- 17 -
2.4 Struktura glykokalyx.....	- 17 -
3. VLASTNOSTI GLYKOKALYX.....	- 19 -
3.1 Hustota glykokalyx	- 19 -
3.2 Propustnost glykokalyx.....	- 19 -
3.3 Deformovatelnost glykokalyx.....	- 20 -
3.4 Tloušťka glykokalyx	- 22 -
4. BUNĚČNÉ INTERAKCE S GLYKOKALYX.....	- 24 -
4.1 Červené krvinky.....	- 25 -
4.2 Bílé krvinky	- 25 -
5. FUNKCE GLYKOKALYX	- 27 -
5.1 Glykokalyx jako brána k endotelu	- 28 -
5.2 Glykokalyx jako mechanopřenašeč	- 28 -
5.3 Glykokalyx jako kontrolní centrum	- 31 -
6. GLYKOKALYX A PATOFYZIOLOGIE	- 32 -
6.1 Diabetes.....	- 32 -
6.2 Ischemie a reperfúze	- 33 -
6.3 Arterioskleróza.....	- 33 -
7. METODY VIZUALIZACE GLYKOKALYX.....	- 34 -
7.1 Transmisní elektronová mikroskopie.....	- 34 -
7.2 Intravitální mikroskopie.....	- 35 -
7.3 Konfokální laserová skenovací mikroskopie	- 35 -
7.4 Dvou-fotonová laserová skenovací mikroskopie.....	- 35 -
8. ZÁVĚR	- 36 -
Seznam zkratk	- 37 -
Seznam literatury	- 38 -

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na shrnutí poznatků o glykokalyx, tenké gelovité vrstvě, kryjící endoteliální buňky na povrchu lumenu cév. Glykokalyx se skládá z proteoglykanů, glykoproteinů a rozpustných složek, kdy změna v tomto složení může omezit či úplně potlačit jeho vlastnosti, jako jsou hustota, propustnost, tloušťka a schopnost obnovy původní stavu po deformaci. Vlastnosti glykokalyx ovlivňují jeho schopnosti interagovat s krevními buňkami a různými molekulami, buněčnou signalizaci, mechanotransdukci, vaskuloprotektivní funkci, reologii, propustnost cév a zánětlivou odpověď. Změna složení a vlastností glykokalyx také hraje důležitou roli v patofyziologii cév, kdy jeho úbytek má za následek mikrovaskulární dysfunkci. Bližší prozkoumání této vrstvy pokrývající povrch endotelu je pro další výzkum klíčové, tudíž pozornost by se měla věnovat i metodám zobrazování glykokalyx. Terapeutické řešení vaskulárních chorob možná závisí právě na možnosti modulace existence a vlastností této ochranné vrstvy.

Abstract

This work is focused on general knowledge of the glycocalyx, a thin gel-like layer covering the surface of endothelial cells in the lumen of blood vessels. Glycocalyx is composed of proteoglycans, glycoproteins, and soluble components. The composition of glycocalyx play key role in glycocalyx properties such as density, permeability, thickness and the capability to restore the original state after deformation. The glycocalyx properties effect ability of glykokalyx to interact with the blood cells and various molecules, cell signaling, mechanotransduction, vasculoprotective function, rheology, vascular permeability and inflammatory response. Modulation of glycocalyx properties and composition plays an important role in the pathophysiology of vascular disease, where its loss leads to microvascular dysfunction. Further examination of this sensitive layer is crucial for future research, therefore, attention should be paid to methods of imaging glycocalyx. Therapeutic solution of vascular disease may depend on our ability to modulate the existence and properties of this protective layer.

1. ÚVOD

Glykokalyx byl poprvé zaznamenán pomocí elektronové mikroskopie v roce 1966 jako 20 nm tenká vrstva, pokrývající endoteliální buňky lumenu cév. Od té doby se metody zobrazování glykokalyx značně rozvinuly. Díky pokroku v těchto metodách vizualizace a následným experimentům máme ucelenější představu o glykokalyx. Představuje složitou biochemickou strukturu fungující jako síto z proteoglykanů, glykoproteinů a rozpustných proteinů, propůjčující glykokalyx důležité vlastnosti. Například propustnost, danou rozdílem osmotických tlaků, hustotu, ovlivněnou záporným nábojem glykokalyx, regeneraci pomocí elastických vláken v důsledku deformace nahromaděním erytrocytů nebo průchodem leukocytů do místa zánětu a v neposlední řadě tloušťku této vrstvy. Tloušťka glykokalyx je velmi složité téma a neexistuje jednotný názor kolik vlastně glykokalyx měří. Je to dáno rozdílnými postupy, přípravou a druhy vzorků. Tyto vlastnosti se mohou měnit například v důsledku ubývání glykokalyx účinkem některých enzymů nebo působením smykového napětí, kdy už pak glykokalyx nedokáže obnovit svou původní velikost.

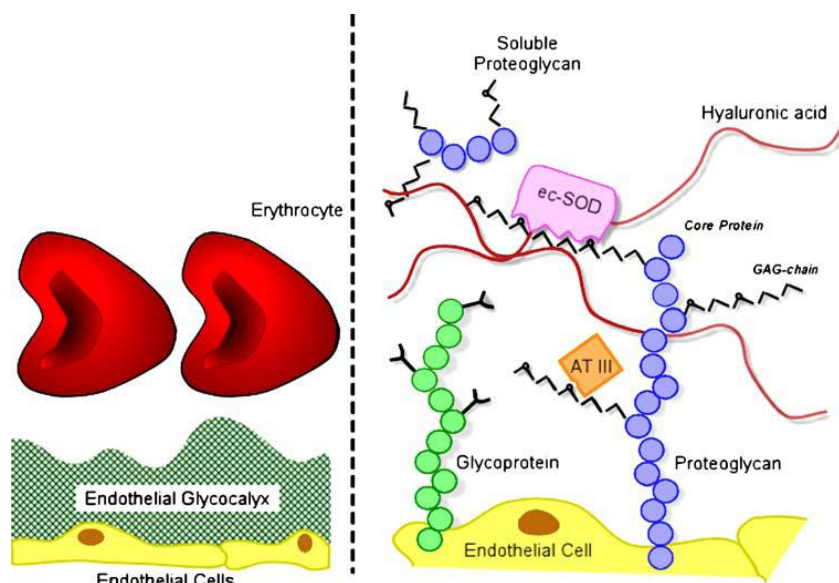
V závislosti na vlastnostech má glykokalyx schopnost interagovat s erytrocyty v úzkých kapilárách, s leukocyty při jejich adhezi, rolování a prostupu cévou do místa zánětu a s různými molekulami, zprostředkovávajícími buněčnou signalizaci. Další jeho typickou funkcí je mechanotransdukce, u které glykokalyx působí jako přenašeč mechanického napětí do cytoskeletu a mění jej na biochemické signály. Má také vaskuloprotektivní funkci a tvoří kluzkou vrstvu pro pohyb erytrocytů krevním řečištěm nebo pro pohyb leukocytů do místa zánětu, a tak ovlivňuje zánětlivou odpověď. Kontroluje i propustnost cév, a to svou vlastní propustností a selekcí vhodných molekul. Pokud dojde k jeho úbytku, zvýší se počet vazeb molekul ke glykokalyx a tím se zvýší i propustnost cév. To může vést k výskytu různých chorob a onemocnění.

Mezi choroby, u kterých předpokládáme význam poškození funkce nebo struktury glykokalyx, patří diabetes, arterioskleróza, ischemie a reperfúze. Jak přesně ovlivňují změny glykokalyx tvorbu a průběh těchto onemocnění zatím není zcela objasněno a je potřeba podrobit toto téma dalšímu výzkumu. Bohužel, glykokalyx je velmi citlivý na manipulaci, a tak je příprava vzorku pro analýzu bez nechtěné tvorby artefaktů význačným problémem. Totéž platí i o metodách vizualizace glykokalyx, kdy použití vhodné metody je klíčové pro jeho správnou detekci. Stručně řečeno, glykokalyx představuje komplexní téma, které si jistě zaslouhuje naši pozornost, a objasnění úplného složení, vlastností a funkcí glykokalyx může vyřešit nejen jeden problém v oblasti patofyziologie cév.

2. STRUKTURA A SLOŽENÍ GLYKOKALYX

Endoteliální glykokalyx, také známý jako endoteliální povrchová vrstva, představuje spleť membránově vázaných makromolekul - proteoglykanů, glykoproteinů a rozpustných složek. Právě polyaniontová povaha těchto složek propůjčuje glykokalyx negativní náboj a umožňuje vazby glykokalyx s pozitivně nabitými proteiny, enzymy, růstovými faktory, cytokiny, aminokyselinami, kationty a vodou. Proteoglykany a glykoproteiny tvoří hlavní molekuly, nazývané „kotevní molekuly“, které upevňují glykokalyx k povrchu endoteliálních buněk. Dají se považovat za páteř této vrstvy. Proteoglykany tvoří centrální proteiny a k nim navázané dlouhé glykosaminoglykanové postranní řetězce, zatímco u glykoproteinů můžeme najít na centrálních proteinech navázané krátké rozvětvené karbohydrátové postranní řetězce (Obr.1). Mezi proteoglykany a glykoproteiny, především na jejich povrchu, se nachází rozpustné molekuly, které jsou v neustálé dynamické rovnováze s proudící krví. Rozpustné proteoglykany zastupuje například kyselina hyaluronová a rozpustné proteiny antithrombin III a extracelulární superoxid dismutáza (Obr.1). (Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

Díky průtoku krve cévami dochází ke změně tloušťky glykokalyx, způsobené průchodem leukocytů do místa zánětu nebo tlakem erytrocytů v těsně přilehlých kapilárách, a následným obnovováním jeho původní velikosti. Glykokalyx je také redukován vlivem smykového napětí kapaliny na stěnu cév nebo působením různých enzymů. Tato redukce se projevuje odlamováním molekul tvořících glykokalyx. Endoteliální glykokalyx pracuje jako celek, tudíž narušení některé z jeho složek enzymy by mohlo závažně poškodit jeho vlastnosti. (Chappell 2009a, Reitsma 2007, Weinbaum 2007)



Obr. 1

Složení glykokalyx

Vlevo: Glykokalyx (endothelial glycocalyx) pokrývající endoteliální buňky (endothelial cells) směrem k lumenu cévy, tvoří trojrozměrnou síť z makromolekul, interagující s krevními buňkami, konkrétně v tomto případě s erythrocyty (erythrocyte).

Vpravo: Molekulární složení glykokalyx. V glykokalyx se vyskytují proteoglykany s centrálními proteiny (core protein) a glykosaminoglykanovými řetězci (GAG-chain), glykoproteiny s karbohydrátovými řetězci a rozpustné proteoglykany (soluble proteoglycan) a proteiny, jako jsou kyselina hyaluronová (hyaluronic acid), extracelulární superoxid dismutáza (extracellular superoxide dismutase, ec-SOD) a antitrombin III (AT III, antithrombin III). (Reitsma 2007)

2.1 Proteoglykany

Proteoglykany jsou považovány za funkčně nejdůležitější membránově vázané molekuly. Skládají se z hlavního centrálního proteinu a sulfátovaných postranních řetězců glykosaminoglykanů (glycosaminoglycan, GAG), které se k němu kovalentně váží.

(Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

GLYKOSAMINOGLYKANY jsou nerozvětvené heteropolysacharidy, složené z opakujících se disacharidových jednotek, jejichž kombinace dávají vznik pěti typům GAG – heparan sulfát (HS), chondroitin sulfát (CS), dermatan sulfát (DS), keratan sulfát

a hyaluronan (kyselina hyaluronová, hyaluronic acid, HA). Disacharidové jednotky tvoří kyselina uronová a hexosamin. Rozdělení GAG do výše jmenovaných typů závisí na vzoru sulfatace a na tom, jestli je přítomná kyselina uronová nebo hexosamin (Reitsma 2007).

Typy GAG:

Heparan sulfát patří mezi nejvíce zastoupené GAG a představuje přibližně 50 – 90% (jeho zastoupení kolísá) z celkového počtu proteoglykanů, včleněných do glykokalyx. Jeho řetězec má 50 – 150 disacharidových jednotek a průměrnou molekulovou hmotnost asi 30 kDa (Weinbaum 2007).

Chondroitin sulfát/dermatan sulfát je druhým nejvíce zastoupeným GAG v glykokalyx. I přesto že je DS považován za samostatný typ GAG, je to ve skutečnosti typ B chondroitin sulfátu. Rozdíl mezi těmito GAG spočívá ve funkci, která se mění u DS s epimerizací kyseliny glukuronové na kyselinu iduronovou. CS obsahuje podobný počet disacharidových jednotek a průměrnou molekulovou hmotnost jako HS (Weinbaum 2007).

Keratan sulfát zastupuje typ GAG, jehož význam pro patofyziologii cév ještě nebyl plně pochopen (Reitsma 2007).

Hyaluronan představuje důležitý, oproti ostatním lišící se, GAG. Hlavní rozdíly spočívají v jeho délce, spojení s membránou a spojením s centrálním proteinem. Jedná se o velmi dlouhý disacharidový polymer, s délkou 1000 - 3500 kDa. S centrálním proteinem není kovalentně spojený vůbec a je syntetizovaný na povrchu buňky. Není sulfátovaný, ale získal hydratační vlastnosti díky negativnímu náboji, kterým jej obdařily karboxylové skupiny. HA také dokáže tvořit viskózní roztoky. Jeho přesné spojení s membránou neznáme, ale nabízí se několik možností – vazba na povrchové receptory CD44 a CS řetězce, spojení s HA syntázami vyskytujícími se na cytosolové straně membrány, nebo vůbec žádné spojení s membránou. V nedávné době byly ovšem objeveny intracelulární vazebné proteiny pro HA – cdc37 a P32. (Laurent 1992, Nandi 2000, Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

Sulfátované GAG tvoří prodloužené šroubovitě smyčky, jejichž konformace závisí právě na vzoru sulfatace, pružnosti monosacharidů a elektrostatických vazbách. Roztažnost GAG řetězce ovlivňují lokální pH a iontové síly, přičemž maximální roztažnost činí až 80 % jeho původní délky (Weinbaum 2007). Strukturu GAG ovlivňují

také vazby s proteiny, závisící podobně jako roztažnost na pH a iontové koncentraci, které jsou nezbytné pro správné fungování glykokalyx. Plasmatické proteiny totiž fungují jako bariéra proti nežádoucím látkám a jejich prostřednictvím také endoteliální buňky regulují fyzikálně-chemické vlastnosti GAG (McGee 2001, Weinbaum 2007).

GAG jako HS a CS/DS se tvoří v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Probíhá tu složitý proces tvorby primárního spojovacího GAG-řetězce, přidání pro každý typ GAG-specifického zbytku a následná modifikace sulfatací a epimerizací. V tomto bodě procesu také dochází k výše popsané epimerizaci CS na DS. Tyto modifikace se již odehrávají v Golgiho aparátu (v obou cis- i trans-), kde se určuje konečný typ a funkce postranních řetězců GAG, tudíž i celého proteoglykanu. Tyto postupné modifikace propůjčují GAG-řetězcům jedinečné funkce. Jediný GAG, který se vymyká tomuto procesu je HA, k jehož tvorbě dochází na cytosolové straně membrány a nevyskytují se u něj pozdější modifikace. Z tohoto důvodu nemá HA žádné sulfátované skupiny či modifikační vzory. Právě rozdílnost těchto sulfatačních vzorů a jejich vliv na vazbu a funkci proteinů dává vzniknout myšlence, že stejné podmínky, které mění tloušťku glykokalyx a GAG sulfatační vzory a náboj, pravděpodobně také řídí prostupnost cév a úpravu vazby a aktivity specifických proteinů. (Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

CENTRÁLNÍ PROTEINY se rozlišují podle velikosti, počtu podtypů, strukturního poměru k membráně endoteliálních buněk a počtu a typu navázaných GAG řetězců na syndekany, glypikany, perlekany, versikany, decoriny, biglykany a mimekany (Reitsma 2007). Existují různé pohledy na to, které z těchto centrálních proteinů patří mezi hlavní. Podle Reitsma et al. (2007) se za hlavní považují syndekany a glypikany, které mají pevné spojení s buněčnou membránou. Syndekany jsou uchyceny transmembránově, zatímco glypikany se nachází na povrchu membrány a jsou k ní připojeny přes glykosylfosfatidylinositol (glycosylphosphatidylinositol, GPI) (Carey 1997). Zbylé skupiny centrálních proteinů jako jsou například perlekany, biglykany a mimekany, se po transformaci svých GAG-řetězců nahromadí v glykokalyx a dochází k tvorbě rozpustných proteoglykanů, které buď prochází do krve, nebo zůstávají v glykokalyx. Weinbaum et al. (2007) však naznačuje, že mezi hlavní skupiny patří i s bazální matrix-spojené perlekany.

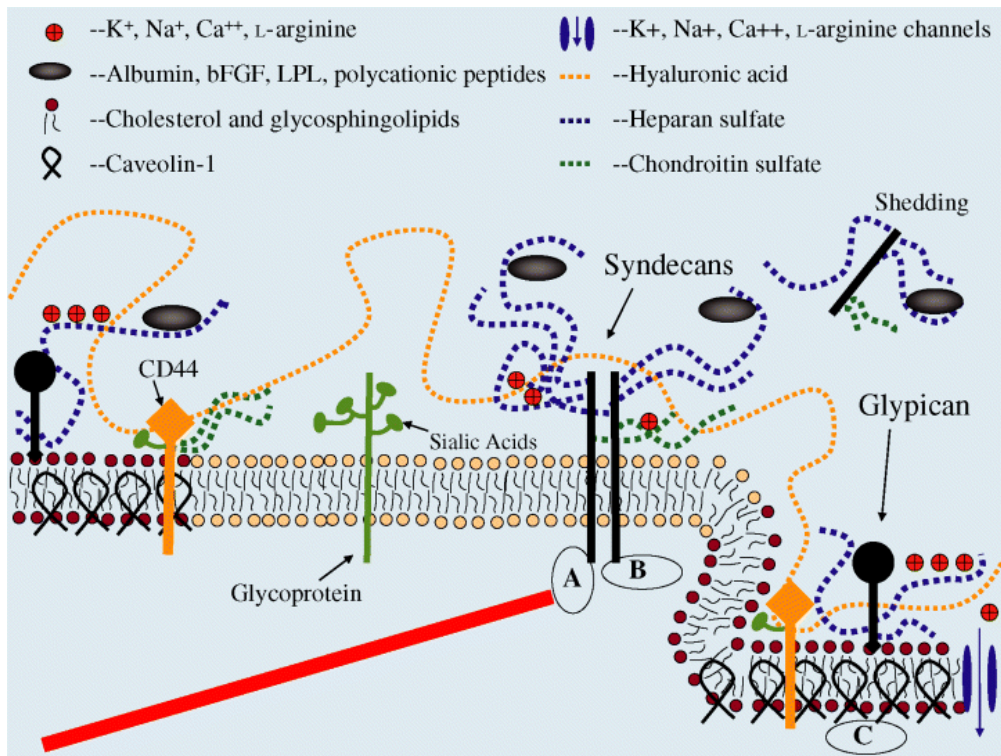
Problémem je však pojmenování jednotlivých proteoglykanů, které se odvozuje od typu GAG-řetězců, nejhojněji navázaných na centrálním proteinu. Na jeden centrální protein se totiž může navázat více typů těchto řetězců, a pak záleží pouze na různých

podnětech a podmínkách, který z těchto řetězců bude převažovat (například stimulace chemokiny). (Reitsma 2007)

Na endoteliálních buňkách se vyskytují nejhojněji syndekan-1, syndekan-2, syndekan-4 a glypikan-1.

Syndekany-1, -2, -4 mají tři vazebná místa pro postranní řetězce GAG, které se nachází poblíž jejich N konce (vzdálené od apikálního povrchu). Na tato místa se navazuje především HS. Syndekan-1 je o něco delší (33 kDa) než zbylé syndekany-2 a -4 (22 kDa) a obsahuje dvě přídatná vazebná místa poblíž membrány, na která se váže CS. Syndekany představují transmembránové proteoglykany, jejichž cytoplasmické ocsy se na druhé straně membrány spojí s cytoskeletem a přes molekuly jako tubulin, dynamin a α -actinin mu pomáhají s organizací. Podílí se na signalizaci buňky tím, že dojde ke změně jejich vazebných vlastností díky fosforylaci cytoplasmických zbytků, fungujících poté jako spínače pro oligomerizaci. (Carey 1997, Tkachenko 2005, Weinbaum 2007)

Glypikan-1 (64 kDa) má poblíž membrány tři až čtyři vazebná místa pro GAG, na která se váže zásadně HS. Samotný glypikan-1 kotví přímo v plasmatické membráně díky C-konci GPI, který rozpozná oblasti bohaté na cholesterol a sfingolipidy (lipidové rafty) a naváže se na ně (Obr. 2). (Weinbaum 2007)



Obr. 2

Složení glykokalyx, pokrývajícího membránu endoteliálních buněk.

Mezi proteoglykany patří transmembránové syndekany (syndecans) a na povrch membrány-navázané glypikany (glypicans), na které se váží GAG-řetězce HS (heparan sulfate), CS (chondroitin sulfate) nebo HA (hyaluronic acid). HA je dlouhý GAG, vlnící se na povrchu glykokalyx a pojící se s membránou přes receptor CD44, vyskytující se v oblastech bohatých na cholesterol a sfingolipidy. Tady se také nachází calveolae tvořené calveolinem-1, včleněným do těchto oblastí. Na glykoproteiny se váže kyselina sialová (sialic acids). Syndekany se mohou navázat na molekuly spojené s cytoskeletem (a) nebo se spojují přímo s intracelulárními signálními efekty prostřednictvím oligomerizace (b). (Weinbaum 2007)

2.2 Glykoproteiny

Glykoproteiny složené z krátkých (2 - 15 cukerných zbytků) rozvětvených karbohydrátových postranních řetězců navázaných na centrální protein patří spolu s proteoglykany ke „kotevním molekulám“. Oligosacharidy v postranních řetězcích se vážou s kyselinou sialovou, která také přispívá k negativnímu náboji glykokalyx. Počet glykoproteinů v glykokalyx závisí na buněčné aktivaci a stimulaci. Mezi glykoproteiny patří adhezni molekuly endoteliálních buněk a složky koagulačního a fibrinolytického systému. (Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

ADHEZNÍ MOLEKULY mají hlavní funkci při buněčné signalizaci a adherenci buněk z krevního řečiště. Rodiny adhezních molekul přítomných v glaukokalyx jsou selektiny, integriny a imunoglobuliny.

Selektiny obsahují cytoplasmatický ocas, transmembránovou doménu, několik souhlasných opakování, doménu epidermálního růstového faktoru a koncovou lektinovou doménu. Typy selektinů, které se vyskytují ve vaskulárním endotelu a účastní se vazeb endotel – leukocyty, jsou E-selektin a P-selektin. (Kansas 1994)

P-selektin je soustavně produkován a ukládán Weibel-Paladeho tělísky (skladovací granula) endoteliálních buněk. Trombin a histamin navodí exocytózu Weibel-Paladeho tělísek a následné přenesení P-selektinu na povrch buňky, tam je po krátké chvíli P-selektin včleněn do lyzozomálních granulí Golgiho aparátu, kde se obnoví v nově vzniklých Weibel-Paladeho tělískách. (Dole 2005, Koedam 1992)

E-selektin není na rozdíl od P-selektinu skladován v granulách, tudíž aby se vyloučil na povrchu buňky, vyžaduje syntézu mRNA a proteinů. Expresi E-selektinu na povrch buňky navozují cytokiny, jako je interleukin-1 a TNF- α (tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy). (Reitsma 2007)

Integriny patří mezi heterodimerické molekuly vyskytující se na mnoha typech buněk, včetně endoteliálních buněk, leukocytů a krevních destiček. Skládají se z nekovalentně vázaných podjednotek α a β , kde každý integrin představuje specifickou kombinaci těchto dvou podjednotek, tvořených cytoplasmatickým ocasem a transmembránovou doménou. Dosud bylo zaznamenáno 18 různých α podjednotek a 8 podjednotek β . Na endoteliálních buňkách se nachází integrin $\alpha V\beta 3$, důležitý zprostředkovatel vazeb krevních destiček na endotel. Dále tam můžeme najít i integriny $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, a $\alpha 6\beta 1$, vážící se na ligandy například lamininu, fibronektinu a kolagenu.

(Bombeli 1998, Reitsma 2007)

Imunoglobuliny se skládají z cytoplasmatického ocasu, transmembránové domény a množství vyčnívajících imunoglobulinových domén. Mezi nejznámější patří intracelulární adhezní molekula 1 a 2 (ICAM-1,-2), adhezní molekula krevních buněk 1 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1) a adhezní molekula endoteliálních buněk a krevních destiček 1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1). Obecně tyto molekuly fungují jako ligandy pro integriny na leukocytech či krevních destičkách a hrají klíčovou roli při adherenci leukocytů k endotelu a jejich diapedéze.

(Bombeli 1998, Reitsma 2007)

GLYKOPROTEINY S FUNKCÍ PŘI KOAGULACI, FIBRINOLÝZE A HEMOSTÁZI jsou druhým typem glykoproteinů vyskytujících se na endoteliálních buňkách.

Příkladem je **komplex Ib-IX-V**, skládající se z glykoproteinů Ib α , Ib β , IX, a V, a vyskytující se na endoteliálních buňkách nebo na krevních destičkách. Komplex Ib-IX-V váže von Willebrandův faktor (vWf) a je proto známý jako vWf-receptor krevních destiček. Navíc také váže P-selektin a tím zprostředkovává vazbu krevních destiček na endotel. (Reitsma 2007)

2.3 Rozpustné složky

Rozpustné složky se do glykokalyx mohou dostat buď z endotelu, nebo z krevního řečiště (například albumin a orosomucoid, kteří chrání propustnost membrány). Patří mezi ně proteiny a rozpustné proteoglykany. Funkčně jsou pro glykokalyx velmi důležité, ale co se týče struktury, moc nejsou významné. I přesto se předpokládá, že vazby mezi membránově vázanými proteoglykany, rozpustnými proteiny a rozpustnými proteoglykany tvoří příčnou síť, která přispívá ke stabilitě glykokalyx v jeho lumenální části. Především HA se přisuzuje velká role vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně dlouhou molekulu neukotvenou v membráně endoteliálních buněk, interagující sama se sebou a tím tvořící stabilní HA-HA komplexy. (Reitsma 2007, Scott et Heatley 1999))

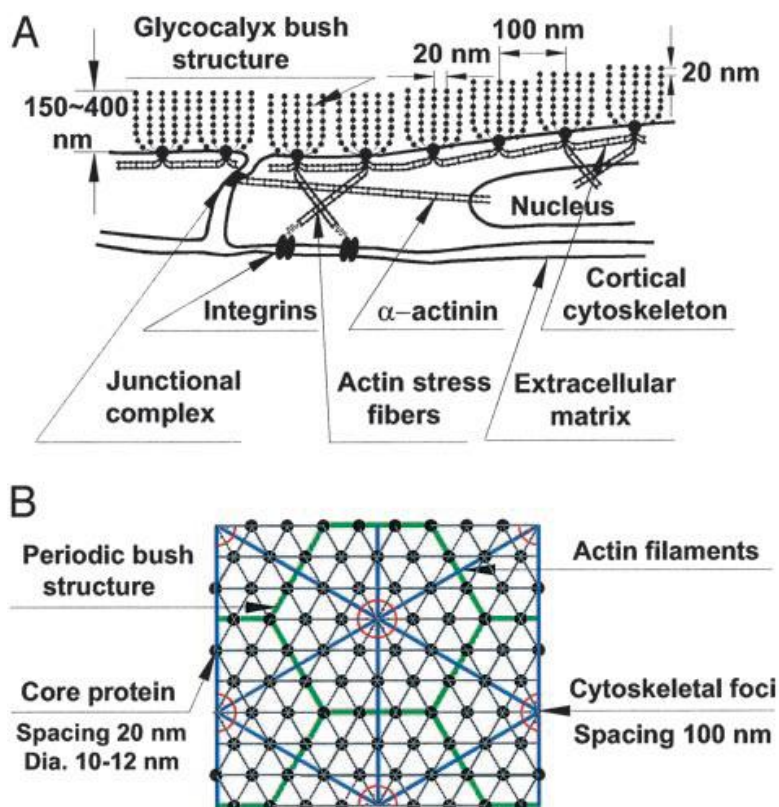
2.4 Struktura glykokalyx

Organizace glykokalyx představuje kvazi-periodickou ultrastrukturu s centrem v cytoskeletárních ohniscích, která ukotvují glykokalyx v podložním cytoskeletu. Jsou pevně spojena s vlákny α -aktininu a napojena na některé integriny. Rozestup mezi jednotlivými ohnisky je 100 nm a průměr jednoho ohniska činí asi 20 nm. Tato ohniska jsou vytvarována do hexagonálních symetrických uskupení na základě pravidelné mřížky z centrálních proteinů (Obr.3b). Pomocí „fluorocarbon oxygen fixation technique“

nebo perfúzních fixačních technik lze spatřit „keříčkovitou“ strukturu glykokalyx podobnou jemným vláskům, rovnoměrně rozloženou na luminálním povrchu (Obr.3a). Model této hexagonální struktury byl použit ke zkoumání osmotického průtoku v glykokalyx, ohybových sil na centrální proteiny a lokální deformace glykokalyx.

(Henry et Duling 1999, Weinbaum 2003, Weinbaum 2007)

V současné době se spekuluje, že výše popsaná organizovaná struktura glykokalyx tvoří pouze vnitřní vrstvu poblíž apikální membrány, širokou jen několik desítek nanometrů. Pokrývá ji vnější vrstva glykokalyx obsahující prodloužené centrální proteiny, měřící přibližně 0,5 μm . Jejich rozhraní pravděpodobně tvoří HA, protože má jak receptory v membráně, tak místa pro vazbu na centrálních proteinech. (Weinbaum 2007)



Obr. 3a,3b

Struktura glykokalyx

A: „Keříčkovité“ struktury glykokalyx (glycocalyx bush structures) jsou vázána přes ohniska na vlákna aktinu (actin stress fibers).

B: Cytoskeletální ohniska (cytoskeletal foci) tvoří hexagonální periodickou „keříčkovitou“ strukturu (periodic bush structure) z centrálních proteinů (core protein) díky aktinové síti (actin cortical web).

(Weinbaum 2003)

3. VLASTNOSTI GLYKOKALYX

Na vlastnosti glykokalyx má vliv mnoho faktorů a pokud dojde ke změně v jejich působení, může to vlastnosti glykokalyx modifikovat. Týká se to například elasticity vláken, propustnosti cévní stěny, regenerace glykokalyx a tloušťky glykokalyx.

3.1 Hustota glykokalyx

Hustota glykokalyx představuje poměrně důležitý faktor. Díky němu je glykokalyx schopen úplného stlačení po průchodu červených krvinek kapilárou a zároveň následné regenerace svých původních rozměrů po proniknutí leukocytů stěnou cévy do místa zánětu. Tato hustota je určena dynamickou rovnováhou interakcí mezi pevně vázanými záporně nabitými molekulami glykokalyx a kladnými kationty a anionty, nacházejícími se v krvi. To sice vede k celkové nábojové neutralitě, ale také k lokálním rozdílům v náboji a vzniku rozdílných nábojů na rozhraní glykokalyx a plazmy. U kapilár žab byla naměřena hustota přibližně 25 – 35 mEq/l, zatímco u kapilár křečka pouhých 0,7 – 2,3 mEq/l. Je tedy patrné, že hustota glykokalyx je mezi savci a obojživelníky rozdílná.

(Stace et Damiano 2001, Weinbaum 2007)

3.2 Propustnost glykokalyx

Rychlost výměny tekutin skrze cévní stěnu byl původně definován Starlingovým principem, který říká, že rychlost výměny je přímo úměrná rozdílu hydraulických a osmotických tlaků (rozdílu koncentrace plasmatických proteinů) mezi lumenem cévy a okolní tkání. Tento fakt byl podložen experimenty, které poukázaly na krátkou reabsorpci a následnou nízkou filtraci v důsledku náhlého poklesu tlaku v kapilárách. Starlingův princip byl později upraven a teorie o celkových rozdílech tlaků se změnila na teorii o lokálních rozdílech. Glykokalyx představující osmotickou bariéru funguje jako molekulární síť pro plasmatické proteiny a Starlingova rovnováha sil je tak aplikována

pouze na tuto vrstvu. Pro zpřehlednění této hypotézy byl vytvořen trojrozměrný model propustnosti, popisující transport vody a rozpustných složek skrze endotel, založený na pórech v endoteliální membráně. Důležitou roli zde hrají těsné spoje (tight junctions), skrze jejichž mezery dochází k proudění vody a rozpustných složek, což může vést k poklesu tlaku v těsných spojích poblíž lumenu cév. Další pokusy také díky nelineárnímu proudění tekutin (vtékání do mezer těsných spojů) dokazují značnou asymetrii v rozdílu tlaků v cévním lumenu a stěně. (Chappell 2010, Reitsma 2007, Starling 1896, Weinbaum 2007)

3.3 Deformovatelnost glykokalyx

Důležitým faktorem pro charakteristické obnovení glykokalyx po průchodu leukocytů je ohybová tuhost centrálních proteinů proteoglykanů. Z nepřímých pozorování byla vyvozena teorie představující centrální proteiny jako elastická vlákna, která jsou spojena s aktinovou sítí v cytoskeletu. Tento model počítá s malými odchylkami určujícími konečné snížení elasticity vláken na úkor celkové krátkodobé deformace po průchodu leukocytů. Později se výzkum zúžil na předpovězení času změny tvarů centrálních proteinů od deformace po jejich následné obnovení. Paradoxem je, jak může glykokalyx být zároveň velmi náchylný k deformaci a přitom být schopný regenerace na svou původní velikost přibližně za 0,5 sekundy (maximálně 1 sekunda) po průchodu leukocytů, které ho mohou deformovat až na 20% jeho původní tloušťky. Byly vypracovány tři modely popisující mechanismus regenerace, zabráňující nevratné deformaci v důsledku smykového napětí kapalin – modely onkotický, elastohydrodynamický a mechano-elektrochemický. (Gittes 1993, Potter 2009, Weinbaum 2003, Weinbaum 2007)

Onkotický model pracuje s myšlenkou, že osmotický tlak vzniká díky rozdílu (byť malému) v koncentracích plasmatických proteinů glykokalyx a plasmatických proteinů volně se vyskytujících v krvi. Analýza prokázala, že rozhraní osmotického tlaku je 20 dyn/cm², což je hodnota plně dostačující na vyzdvižení červených krvinek nad glykokalyx, ale přitom tak malá, že vzdálenost červených krvinek a glykokalyx se blíží nule. Později se přešlo na hypotézu, že mechanismus regenerace není povahy

mechanické (elastické), ale chemické. Tvrdí, že funguje dynamická rovnováha mezi pnutím (napětím) v glykokalyx a osmotickým tlakem glykokalyx. Zvýšení osmotického tlaku má za následek zvýšení pnutí a následné stlačení glykokalyx, což vede k výsledné regeneraci - zvýšení tlakového rozdílu a uvolnění napětí v glykokalyx. Po obnovení glykokalyx opět dochází k návratu do původní rovnováhy tlaku a napětí. Mnohem větší osmotický tlak než je 20 dyn/cm² může být potlačován elastickými vlastnostmi centrálních proteinů, jak je znázorněno v následujícím modelu. (Pries 1997, Secomb 1998, Weinbaum 2007)

Elastohydrodynamický model počítá s ohybovou tuhostí jako s velmi důležitým faktorem, díky kterému je glykokalyx schopen ustát stlačení snížením osmotického tlaku a deformaci smykovým napětím proudících kapalin. Existují dvě fáze opětovného vrácení vláken zpět do původní polohy. V první fázi dojde ke stlačení glykokalyx na méně než 36% jeho původní tloušťky a ohybu elastických vláken. Vlákná se potom překrývají a jsou rovnoběžná s endotelem. V druhé fázi se vlákna uspořádají do tvaru podobného mřížce a rovnoměrně si mezi sebou rozdělí zátěž. Přechod z první fáze do druhé trvá 0,041 sekundy, za podmínky, že byl glykokalyx předtím stlačen až na 20% své tloušťky. (Weinbaum 2007)

Mechano-elektrochemický model se zaměřuje na strukturální integritu glykokalyx, představující směs elektrostaticky nabitých makromolekul a elektrolytu. Regenerace glykokalyx je podle něj řízena elektrostatickými a chemickými složkami, dohromady tvořícími elektrochemický gradient. Čas obnovení glykokalyx se určuje pomocí hustoty náboje, dané vazbou záporného náboje glykokalyx a kladných iontů v krvi, a koncentrace makromolekul (glykoproteiny a proteoglykany s glykosaminoglykany) vzhledem ke koncentraci krvinek v lumenu cévy. Z toho plynou dva typy mechanismů nastolující obnovení glykokalyx. První regenerační silou je gradient chemického potenciálu, kde převažuje koncentrace makromolekul nad hustotou náboje. Tento typ se v zásadě neliší od onkotického modelu, popsaného výše. Druhý regenerační mechanismus je gradient elektrochemického potenciálu, kde převažuje hustota náboje nad koncentrací makromolekul. To vede ke zvýšení tlaku na červené krvinky na hodnotu 20 - 30 dyn/cm² (1dyn = 10⁻⁵ Newtonů), což ústí opět k vyzdvihnutí červených krvinek nad glykokalyx. (Damiano et Stace 2002, Secomb 2001, Weinbaum 2007)

3.4 Tloušťka glykokalyx

Mezi největší nevyřešené problémy týkající se glykokalyx patří jeho tloušťka. Jedná se o velmi sporné téma a i přes četné experimenty neexistuje jednotný názor na přesnou hodnotu tloušťky této vrstvy. Nejdříve převažoval názor, že glykokalyx je široký pouhé desítky nm, později se však ukázalo, že je mnohem silnější. V důsledku toho funguje jako vaskuloprotektivní vrstva, která nejenom zprostředkovává odstup molekul a krvinek od stěny cév, ale také zpomaluje tok plazmy a tlumí smykové napětí kapalin působící na endotel (Chappell 2009a, Savery et Damiano 2008). Tloušťka glykokalyx závisí na mnoha faktorech, jako jsou například rozdíly v technice vizualizace, rozdíly v typech cév a orgánů z nichž je odebrán vzorek, mezidruhové rozdíly, rozdíly ve zobrazení vnější nebo vnitřní vrstvy glykokalyx, rozdílná rychlost průtoku krve cévou, a v neposlední řadě rozdíly mezi pokusy *in vivo*, *in vitro* a *ex vivo* (Chappell 2009a). Co ale bylo pokusy dokázáno, je fakt, že rozdíly v tloušťce glykokalyx za tělesné a pokojové teploty se neliší výrazně od nuly, tudíž šířka glykokalyx není závislá na teplotě (Potter et Damiano 2008). I když tloušťka glykokalyx závisí na tolika faktorech, dal by se její rozsah určit jako 0,4 – 4 μm , s obecným průměrem okolo 2 μm (Chappell 2009a).

Rozdíly v technice vizualizace se týkají hlavně elektronové mikroskopie a intravitální mikroskopie. U elektronové mikroskopie dále ovlivňují tloušťku glykokalyx různé druhy barvení, značení a fixace imerzí nebo promýváním. Například u značení pomocí „Ruthenium red“ byla tloušťka glykokalyx asi 20 nm, u barvení „Alcian blue 8GX“ 200 – 500 nm, díky ošetření vzorku před fixací a barvením hyaluronidázou byla změřena hodnota 100 – 200 nm a pomocí fluorokarbon-glutaraldehydové fixace byla tloušťka glykokalyx < 50 nm (Reitsma 2007, Weinbaum 2007). Důležitá je i dehydratace před fixací nebo jiné fixační postupy, které ovšem velmi často vedou ke kolapsu glykokalyx. Dojde tak k odštěpení mukopolysacharidových struktur a přetrvání fragmentu původního glykokalyx, který měří pouze 20 – 50 nm (Potter et Damiano 2008). Co se týče fixace imerzí, tak žádný glykokalyx nebyl pozorován, pokud nedošlo i k fixaci promýváním. To naznačuje spontánní ubývání glykokalyx během fixace imerzí (Chappell 2009a). Elektronová mikroskopie je použitelná jen pro glykokalyx *in vitro*, glykokalyx *in vivo* je možné změřit světelnou mikroskopií, ale opět s obtížemi způsobenými bodem

lomu světla. Sloučení těchto dvou technik za použití dextransu jako plazmatického ukazatele s sebou nese opět riziko ubývání glykokalyx následkem tvorby volných kyslíkových radikálů (Potter et Damiano 2008). První odhad tloušťky glykokalyx provedl Weinbaum (2007), který pomocí elektronové mikroskopie naměřil glykokalyx široký 100 nm. Pozdější měření intravitální mikroskopií ukázalo tloušťku glykokalyx 0,4 – 0,5 μm , což je 4 – 5krát větší hodnota než u výstupů z elektronové mikroskopie (Reitsma 2007, Weinbaum 2007).

Rozdíly v typech cév a orgánů jsou jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících tloušťku glykokalyx. Tyto rozdíly jsou nejvíce patrné mezi úzkými a širokými cévami. Úzké cévy mají hodnotu glykokalyx 0,2 – 0,5 μm a široké cévy 2 – 4 μm (Chappell 2009a). Oproti tomu tloušťka glykokalyx je u kapilár a venul asi 0,51 μm a u arteriol 0,38 μm , měřeno za stejného průměru cévy a stejných hemodynamických podmínek. Rozdíl činí 0.13 μm , což už je považováno za statisticky významnou hodnotu. Stejně hemodynamické podmínky naznačují, že toto prostředí není pro rozdíl v tloušťce glykokalyx významné (Savery et Damiano 2008).

Mezidruhové rozdíly nehrají tak významnou roli v tloušťce glykokalyx, ale přesto je nutno je alespoň zmínit. Jedná se například o rozdíl mezi lidskou pupečnickovou žílou, kde hodnota šířky glykokalyx je 0,03 μm , a kravskou aortou, kde glykokalyx měří 0,02 μm (Potter et Damiano 2008).

Rozdíly ve zobrazení vnější a vnitřní vrstvy glykokalyx spočívají v tom, že vnitřní vrstva glykokalyx, nacházející se poblíž membrány endoteliálních buněk a mající pevnou a stabilní strukturu, měří jen několik desítek nanometrů. Oproti tomu vnější vrstva glykokalyx, tvořená převážně prodlouženými centrálními proteiny a rozpustnými složkami, má šířku přibližně 0,5 μm (Weinbaum 2007). To způsobuje rozpory v chápání toho, co se dá vlastně považovat za glykokalyx. Proto bývá často celý tento komplex vrstev pro zjednodušení situace často nazýván povrchová endoteliální vrstva (Reitsma 2007, Weinbaum 2007).

Rozdílná rychlost průtoku krve cévou má také určitý vliv na tloušťku glykokalyx, zvláště díky smykovému napětí kapalin. Nejhorší možnost nastává v okamžiku, kdy dojde k dočasnému zastavení průtoku krve a nahromadění erytrocytů v lumenu cévy, což vyvolá deformaci glykokalyx (Weinbaum 2007). Za neporušeného průtoku krve byla v myši karotidě naměřena tloušťka glykokalyx 399 nm, zatímco narušený průtok v oblasti sinů karotidy snížil tuto hodnotu až na 73 nm (Reitsma 2007).

Rozdíly mezi pokusy *in vivo*, *in vitro* a *ex vivo* patří mezi nejvýznamnější faktory, modulující tloušťku glykokalyx. Ta je rovna v případě *in vivo* průměrně 0,52 μm , *in vitro* pouze 0,02 – 0,03 μm a *ex vivo* 878 nm. Zda jsou mezi *in vivo* a *in vitro* rozdíly i po molekulární stránce (složení a struktura glykokalyx) zatím není objasněno. Je ovšem možné, že většinu rozdílů v tloušťce glykokalyx má na svědomí izolace a fixace endoteliálních buněk, počínající přerušením přítoku krve, zvláště když není známo, zda má glykokalyx schopnost regenerace i *in vitro* (Chappell 2009a).

4. BUNĚČNÉ INTERAKCE S GLYKOKALYX

Interakce s červenými a bílými krvinkami jsou důležitým faktorem ovlivňujícím glykokalyx. Díky těmto interakcím dochází k deformaci glykokalyx ať už třením erytrocytů o glykokalyx v těsně přilehlých kapilárách, nebo průchodem leukocytů do místa zánětu. Následující kapitoly jsou proto věnované těmto významným faktorům.

4.1 Červené krvinky

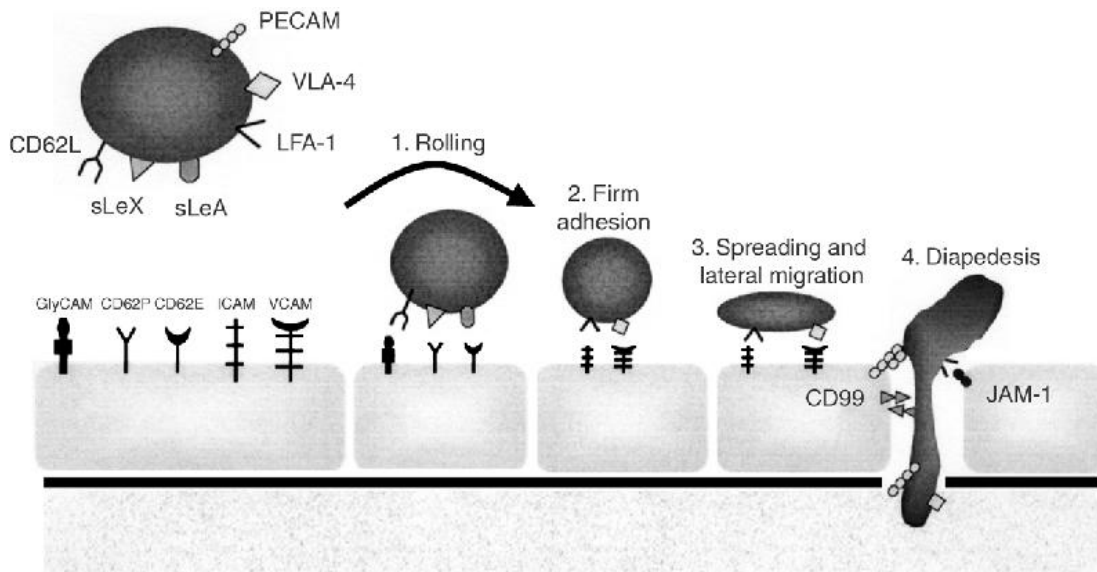
Princip interakce erytrocytů s glykokalyx je způsoben zastavením průtoku krve lumenem cévy, přičemž erytrocyty vyplní celý lumen, „ponoří se“ do glykokalyx a deformují jej. S obnovením průtoku krve cévami (se zvyšující se rychlostí) se erytrocyty z glykokalyx začnou pomalu vynořovat až dojde k vyzdvihnutí erytrocytů (po překročení kritické rychlosti) a vzniku tenké kluzké vrstvy na rozhraní glykokalyx a červených krvinek. (Vink et Duling 1996)

Experimenty prováděné na toto téma se zaměřovaly na problematiku efektu glykokalyx na odpor kapiláry a kapilární hematokrit, představující poměr mezi objemem červených krvinek a objemem krve. Výsledky se shodovaly v tom, že i přítomnost tenké hydratované vrstvy makromolekul, široké přibližně 0,5 μm , by významně zvýšila odpor kapiláry a snížila hematokrit, jak bylo ověřeno použitím modelů skleněných trubiček (Secomb 1998). Tato vrstva způsobuje také protáhnutí erytrocytů (maximum při $>1000 \mu\text{m/s}$), což ovšem neplatí v kapilárách kosterních svalů, kde se díky pomalému průtoku krve (100 – 200 $\mu\text{m/s}$) může uplatnit ohybová pružnost membrány erytrocytů a mohou začít fungovat obnovovací mechanismy. Vyzdvihávání erytrocytů z glykokalyx je řízeno dynamickou vztakovou silou, která vzniká v důsledku průtoku plasmy v pórovité síti glykokalyx. (Secomb 2001, Weinbaum 2007)

4.2 Bílé krvinky

Princip interakce bílých krvinek a glykokalyx se týká buď volného rolování, nebo adheze leukocytů ke glykokalyx během zánětu, jejich navázaného rolování prostřednictvím microvilli, kterými penetrují glykokalyx, a jejich prostupu do místa zánětu (Obr.4). (Vink et Duling 1996, Weinbaum 2007)

Adhezi leukocytů iniciují L-, P- a E-selektiny a $\alpha 4$ integriny, které se naváží na ligandy nacházející se na koncích microvilli leukocytů (Obr.5). Bohužel není dosud známo, jakým způsobem glykokalyx ovlivňuje navázání a přilnutí leukocytů či jejich volné rolování. (Weinbaum 2007)



Obr. 5

Mechanismus interakce leukocytů s glykokalyx s detailem na jednotlivé adhezivní molekuly

1. Selektiny zprostředkované rolování leukocytů - GlyCAM (glykosylation-dependent cell adhesion molecule, adhezivní molekula závislá na glykosylaci), CD62P, CD62E
2. Integriny zprostředkovaná adheze (ICAM, VCAM)
3. „Spreading“ a migrace do těsných spojů endoteliálních buněk zprostředkovaná integriny (ICAM, VCAM)
4. Diapedéza zprostředkovaná integriny, PECAM-1, CD99 a JAM-1 (junctional adhesion molecule 1, adhezivní molekula těsných spojů 1)

(Eardley et Cockwell 2005)

Otázkou je, zda volně rolující leukocyty jsou schopny svými microvilli penetrovat glykokalyx a navázaně rolovat. K iniciaci navázaného rolování dochází při vstupu leukocytů z kapilár do postkapilárních venul. V tomto místě se dostávají microvilli leukocytů do těsného kontaktu s povrchem endoteliálních buněk kvůli předešlé deformaci glykokalyx leukocyty, v důsledku malého průměru postkapilárních venul. V širších cévách je volné rolování nepravděpodobné, protože nedochází k deformaci glykokalyx. Délka microvilli je totiž přibližně 0,3 – 0,7 μm , což jim neumožňuje přímý kontakt s receptory na povrchu endotelu a navázané rolování. Nabízí se tak myšlenka, zda leukocyty dokáží klouzat po glykokalyx bez toho, aby jej penetrovaly. (Ley 1996, Vink et Duling 1996, Zhao 2001)

Při volném rolování, mezi tělem leukocytu a endotelem jako rolovacím povrchem působí slabé gravitační síly, které ovšem můžou být na konečcích microvilli zesíleny 20 – 100krát díky viskózním silám, k jejichž vzniku dochází na vrstvě mezi leukocytem a rolovacím povrchem (Zhao 2001). Microvilli tu působí jako tuhé výčnělky, jenž se

dotýkají povrchu pouze 0,2 ms v důsledku nižšího smykového napětí, než je obvyklé u navázaného rolování, kde je čas dotyku elastických microvilli 0,77 s (přibližně o tři řády vyšší). Díky zvýšení smykového napětí nevzroste (u microvilli o stejné délce) jen čas dotyku, ale také síla penetrující glykokalyx. Ovšem u heterogenních microvilli (různá délka) i přes stejnou hodnotu smykového napětí může síla penetrující glykokalyx vzrůst z 8 až na 30 pN (o řád vyšší) (Bruehl 1996, Tissot 1992, Zhao 2001)

Pro změření hloubky penetrace byla vymyšlena teorie o kolmém pohybu koule se simulovanými microvilli v Brinkmanově mediu vůči rovinné ploše. Rozměry koule byly 0.1 μm , microvilli 40 nm, rychlost penetrace 6 $\mu\text{m/s}$, působící síla 1pN a smykové napětí 10 dyn/cm². Hodnota hloubky penetrace microvilli leukocytů glykokalyx měřila pro stejně dlouhé microvilli 1,0 nm a pro heterogenní microvilli 20 nm. Velký rozdíl v hodnotách je způsoben krátkou délkou času doteku homogenních microvilli s povrchem, který je za tohoto smykového napětí $\leq 0,1$ ms. To vysvětluje, proč na arteriální straně krevního oběhu můžeme pozorovat pouze volné rolování leukocytů (Weinbaum 2007, Zhao 2001). Na arteriální straně totiž smykové napětí kapalin nepřesahuje 10 dyn/cm² a leukocyty tudíž nemohou penetrovat glykokalyx (Savery et Damiano 2008, Weinbaum 2007). Oproti tomu u navázaného rolování heterogenními microvilli je síla penetrace za stejného smykového napětí mnohem vyšší a leukocyty snadno penetrují glykokalyx a vytvoří si nové přípoje pro své další rolování. Toto představuje důvod, proč když leukocyty zahájí rolování u východu z kapiláry, mohou ho snadno udržovat i v postkapilární venule. (Weinbaum 2007)

5. FUNKCE GLYKOKALYX

Glykokalyx, pokrývající endoteliální buňky, hraje důležitou roli v jejich ochraně. Zprostředkovává buněčné interakce, kontroluje propustnost cév, a tak funguje jako jakási brána k endotelu, přes kterou musí projít všechny buňky a molekuly. Také má významnou funkci jako mechanopřenašeč - přenáší smykové napětí kapalin do cytoskeletu a tím ho překládá do biochemických signálů. V neposlední řadě působí jako kontrolní centrum pro prostředí endotelu, což se projevuje selekcí vhodných molekul, jejich vzájemnou vazbou, ovlivňováním biodostupnosti NO a regulací zánětlivé odpovědi. Tyto významné funkce jsou v následujících kapitolách podrobněji rozepsány. (Reitsma 2007)

5.1 Glykokalyx jako brána k endotelu

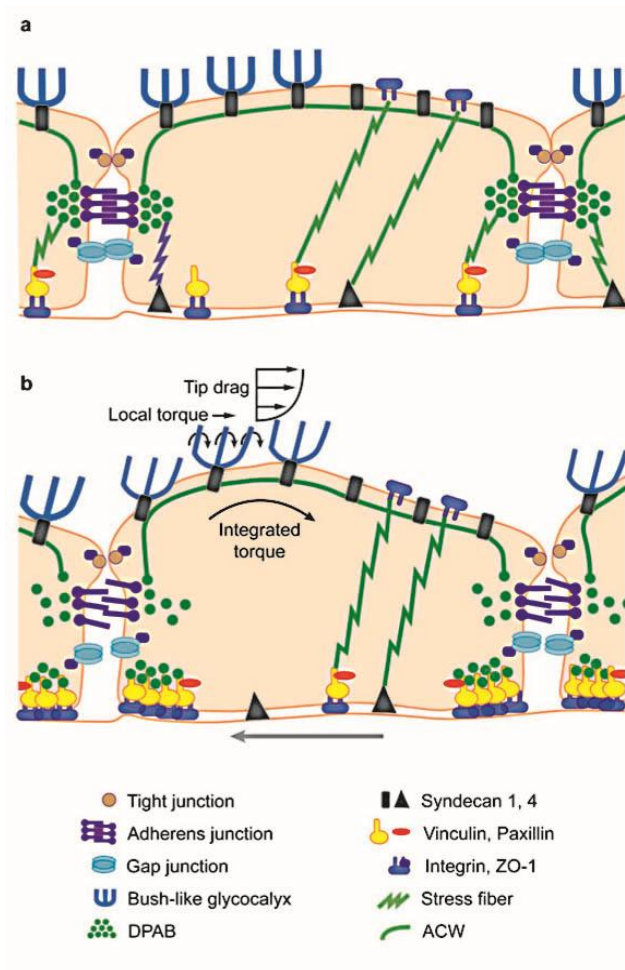
Schopnost glykokalyx fungovat jako brána k endoteliálním buňkám spočívá v tom, že dokáže zamezit přístup některým molekulám, a tím kontroluje propustnost cév a všechny interakce endotelu s bílými a červenými krvinkami. Co se týče propustnosti, ta je modulována glykokalyx, představující prostorovou překážku s negativním nábojem, a také osmotickými tlaky působícími přes tuto vrstvu. U buněčných interakcí glykokalyx má za funkci ukotvení adhezních molekul a zároveň regulaci adheze leukocytů k těmto molekulám. Leukocyty s adhezními molekulami, chráněnými řetězci GAG a rozpustnými proteiny, interagují pomocí ligandů na konečných microvilli, které perforují glykokalyx a naváží se na jeho receptory. U některých adhezních molekul však v důsledku zkracující se délky ubývají i interakce s leukocyty, neboť microvilli leukocytů nejsou schopny dosáhnout na odpovídající receptor. Existují ale určité podněty, které dokáží způsobit úbytek glykokalyx, a tak otevřít prostor více interakcím. Jsou to enzymy a cytokiny, jako například heparitináza, oxidovaný nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein, LDL) a TNF α . Dále můžou glykokalyx poškodit i různé patofyziologické jevy, jako je ischemie a reperfuze. Nejen leukocyty, ale i krevní destičky mohou interagovat s glykokalyx. Podobně jako u leukocytů, vzroste počet jejich interakcí po úbytku glykokalyx v důsledku například oxidovaného LDL. Přítomnost glykokalyx ovlivňuje nejen propustnost cév a buněčné interakce, ale má také dopad na reologii – moduluje hematokrit a lokální hustotu krve. (Reitsma 2007, Weinbaum 2003)

5.2 Glykokalyx jako mechanopřenašeč

Princip mechanotransdukce spočívá v mechanodetekci smykového napětí extracelulárními GAG-řetězci, přenosu signálu centrálními proteiny do cytoskeletu a zahájení buněčné signalizace (stimulace biomolekulární buněčné odpovědi a regulace cév). Účast jak GAG tak centrálních proteinů dokazuje, že jednotlivé složky glykokalyx operují společně, a tak je glykokalyx zodpovědný za mechanotransdukci jako celek (Davies 1995, Weinbaum 2003). Mechanismy zprostředkovávání mechanotransdukce glykokalyx jsou tři – decentralizovaná signalizace rozšířená do různých míst buňky,

centralizovaná signalizace specifickými signálními molekulami a nakonec regulace lokálních koncentračních gradientů společně s transportem růstových faktorů, aminokyselin a iontů. Výše zmíněná decentralizovaná signalizace probíhá přes transmembránové syndekany do různých oblastí, jako jsou například organely, nucleus, intercelulární spoje a bazální adhezní destičky, z nichž poslední dvě jsou zodpovědné za dodatečnou detekci smykového napětí, dokonce i za nepřítomnosti glykokalyx (Davies 1995, Reitsma 2007, Weinbaum 2007). Za podmínky, že je glykokalyx narušen, může reorganizace cytoskeletu (v důsledku přenosu napětí) a následná buněčná biochemická odpověď buňky dokonce úplně zaniknout. Experimentálně bylo dokázáno, že za nepřítomnosti glykokalyx bylo smykové napětí 10 dyn/cm², za přítomnosti neporušeného glykokalyx se hodnota smykového napětí snížila až na 5 dyn/cm² a docházelo k reorganizaci cytoskeletu a za oslabeného glykokalyx k reorganizaci nedošlo. To dokazuje funkci glykokalyx jako mechanopřenašeče a existenci prahové hodnoty smykového napětí pro reorganizaci cytoskeletu. (Reitsma 2007, Thi 2004, Weinbaum 2007)

Aplikace modelu „bumper-car“ (nárazníku) osvětlila roli glykokalyx v aktivaci reorganizace cytoskeletu. Za situace, kdy smykové napětí nepůsobí (Obr.6a), se k sobě sousední laterální buněčné husté skupiny periferního aktinu (dense peripheral actin band, DPAB) váží pomocí cadherinů tvořících adherentní spoje, a tak působí jako jakési nárazníky, bránící promáčknutí endoteliálních buněk. Pokud ovšem na glykokalyx působí smykové napětí (Obr.6b), ohnutí centrálních proteinů způsobí točivý moment, který natočí DPAB a oddělí cadherinové vazby, tím pádem rozpojí adherentní spoje. To vysvětluje, proč se buňky protahují ve směru průtoku krve cévami. Působení smykového napětí způsobí natočení DPAB, tvorbu stresových vláken, přerozdělení F-aktinu a formování dočasných adhezních ohnisek, která se skládají právě z aktinu, vinculinu, paxillinu, integrinů a proteinu těsných spojů 1 (tight junction protein 1 – zona occludens 1, ZO-1). Na DPAB se váže aktinová cytoskeletární síť, která nad nimi vytváří klenbu podpírající apikální povrch buňky, a která se váže na ohniska centrálních proteinů. Přes ní potom prochází stresová vlákna, sloužící k přenášení smykového napětí přímo na bazální adhezní destičky. Tlak, působící na apikální membránové integriny, je nezávislý na přítomnosti glykokalyx, tudíž migrace paxilinu do potenciálních adhezních ohnisek je stejná v případě neporušeného i degradovaného glykokalyx. (Thi 2004, Weinbaum 2007)



Obr. 6

Mechanotransdukce – schéma aktivace cytoskeletu

A: Endoteliální buňka bez smykového napětí a její keříčkovitý glykokalyx (bush-like glykokalyx), těsné spoje (tight junctions), adherentní spoje (adherens junctions), DPAB neporušené s pevnou aktinovou cytoskeletární sítí (actin cortical web, ACW).

B: Smykové napětí ohýbající centrální proteiny glykokalyx, rozpojení DPAB a adherentních spojů, tvorba adhezních ohnisek a přenos smykového napětí stresovými vlákny (stress fiber) do cytoskeletu.

(Weinbaum 2007)

Smykové napětí působící na endotel určuje morfologii a funkci buňky. Biochemickou odpovědí na přenos smykového napětí do cytoskeletu je například produkce NO. Působení NO navozuje vazodilataci, k níž ovšem nemůže dojít pokud je NO nedostupný, a tak se glykokalyx stává klíčovým ve fyziologii cév. Syndekany a glypikany se váží na membránovou oblast s calveolae, kde se vyskytuje i endoteliální NO syntáza (eNOS). Buď přenáší signál na signální proteiny, které spustí signalizační

kaskády, nebo přímo jako pevné složky glykokalyx ovlivňují aktivaci eNOS. Některé GAG jsou napojené na tyto syndekany a glypikany, tudíž pokud dojde k odstranění těchto GAG, nemůže probíhat detekce, amplifikace a přenos smykového napětí a reorganizace aktinu. Mezi GAG blokuující tvorbu NO patří HS, HA a také kyselina sialová u glypikanů. U CS je potvrzeno, že jeho degradace biodostupnost NO nesnižuje. Při pokusech, týkajících se produkce NO, byla k experimentální degradaci HS použita heparináza III, pro HA hyaluronidáza, pro kyselinu sialovou neuraminidáza a pro CS chondroitináza. Zároveň však žádný z těchto enzymů, potlačujících produkci NO, nepůsobil negativně na produkci PGI₂ (prostacyklin), jehož tvorba také patří k charakteristické odpovědi endoteliálních buněk na mechanické signály. (Florian 2003, Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

Na závěr této kapitoly je nutno poznamenat, že experimenty mohly být ovlivněny v důsledku zvýšené propustnosti glykokalyx způsobené mediem prostým proteinů, což mohlo zmenšit tloušťku glykokalyx. To by také vysvětlovalo některé sporné výsledky. Stručně řečeno, neporušený glykokalyx přenáší smykové napětí přes s cytoskeletem spojené syndekany a s plasmatickou membránou spojené glypikany, které následně spouští buněčnou signalizaci decentralizovanou i centralizovanou. U degradovaného glykokalyx se smykové napětí dostává blíže k apikální membráně a stresová vlákna jej pak přenáší dál k adhezním destičkám, a tím spouští pouze signalizaci decentralizovanou. V tomto případě je signalizace nezávislá na struktuře glykokalyx. (Weinbaum 2007)

5.3 Glykokalyx jako kontrolní centrum

Glykokalyx funguje jako kontrolní centrum mikroprostředí krevních cév díky svému heterogennímu povrchu, ke kterému se můžou vázat molekuly z plasmy. Další jeho schopností je vázání látek eliminujících kyslíkové radikály, jako je například ec SOD, která redukcí oxidativního stresu udržuje biodostupnost NO. Mezi molekuly, vážící se ke glykokalyx, patří receptory a enzymy s jejich ligandy, molekuly derivované z plasmy a enzymy s jejich agonisty a inhibitory. Receptory a enzymy s jejich ligandy svým navázáním na glykokalyx lokálně zvyšují svoji koncentraci, což jim umožňuje enzymatickou modifikaci a správnou signalizaci. Takto dochází k signalizaci růstovými

faktory fibroblastů (fibroblast growth factor, FGF) nebo vazbě lipoprotein lipázy a LDL. Molekuly derivované z plasmy a ukotvené v glykokalyx spouští genovou transkripci regulovanou růstovými faktory, zprostředkovanou vzniklým lokálním koncentračním gradientem. Vaskuloprotektivně působí enzymy a jejich agonisté a inhibitory, navázané na glykokalyx, mezi něž patří protisrážlivé molekuly jako jsou antithrombin III, heparin kofaktor II, thrombomodulin a inhibitor tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor, TFPI). Glykokalyx a tyto antikoagulační mediátory v něm obsažené, přispívají také k thromboresistentní povaze endoteliálních buněk. V neposlední řadě, glykokalyx je schopný vázat k sobě cytokiny a oslabovat tak jejich vazby na endoteliální receptory, což má za následek regulaci zánětlivé odpovědi. (Allen 2001, Reitsma 2007)

6. GLYKOKALYX A PATOFYZIOLOGIE

Poškození glykokalyx hraje klíčovou roli v patofyziologii řady onemocnění. Když dojde k jeho narušení, jsou negativně ovlivněny zásadní funkce glykokalyx, jako jsou ochrana cév, signalizace, mechanotransdukce, zprostředkovávání buněčných interakcí a modulace propustnosti cév. Níže jsou popsány tři patofyziologické stavy, ve kterých hraje glykokalyx důležitou roli, a to diabetes, ischemie/reperfúze a arterioskleróza. Je nutno provést další výzkumy, počínaje funkcí specifických GAG domén, o roli glykokalyx v cévních chorobách. A pokud bude narušení glykokalyx běžným projevem u těchto chorob, mohla by do budoucna být regenerace glykokalyx klíčová při eliminaci těchto nemocí. (Reitsma 2007)

6.1 Diabetes

Diabetes patří v dnešní době mezi nejznámější nemoci. Mohou ji doprovázet i další choroby, jako jsou retinopatie, nefropatie a zvýšené nebezpečí kardiovaskulárních chorob. Mezi projevy diabetes patří nedostatek insulinu a následná hyperglykémie a poškození glykokalyx vedoucí ke zvýšené propustnosti cév a dysfunkci eNOS. Poškození glykokalyx za hyperglykémie se projevuje zvýšenou hladinou hyaluronidázy

a zároveň HA, což je způsobeno zvýšenou syntézou HA v důsledku jeho ubývání vlivem hyaluronidázy. Celkově je při této nemoci běžné dlouhodobé zmenšení rozměrů glykokalyx, nicméně je potřeba prověřit, zda toto porušení glykokalyx je zodpovědné za komplikace při diabetes. (Du 2001, Nathan 2003, Reitsma 2007)

6.2 Ischemie a reperfúze

Druhou nemocí, jejíž projevem je i úbytek glykokalyx, je ischemie a reperfúze. Ischemie může být dvojího typu – totální ischemie, kde dochází k úplnému zastavení průtoku krve cévami, a částečná ischemie, kde dojde pouze k oslabení průtoku. Při reperfúzi se tento průtok krve obnoví, což s sebou ale nese i jisté komplikace způsobující mikrovaskulární dysfunkci. Mezi ně patří vypouknutí a odtržení endoteliálních buněk od bazální membrány, zvýšený oxidativní stres a adheze, rolování a diapedéza leukocytů. To vede k ubývání glykokalyx odštěpováním GAG řetězců a následnému zvýšení propustnosti cév. GAG, prokázaně se podílející na ochraně cév proti ischemii/reperfúzi, jsou HS a HA. Pokud dojde ke zvýšení jejich koncentrace v oběhu ještě před vypuknutím této choroby, jsou schopné zabránit jejím negativním důsledkům. Pokusy bylo dokázáno, že inhibice xantino-oxidoreduktázy způsobí potlačení tvorby reaktivních kyslíkových radikálů. Také adenosin při nízké koncentraci má schopnost zabránit úbytku glykokalyx a degranulaci žírných buněk aktivací svého A2A receptoru, zatímco za vysoké koncentrace aktivací svého A3 receptoru působí přesně opačně. Tyto poznatky mohou mít velký význam při terapeutických zákrocích.

(Chappell 2009b, Platts 2004, Rubio-Gayosso 2006, Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

6.3 Arterioskleróza

Arterioskleróza patří mezi další závažné choroby, u níž není opět zcela objasněná role glykokalyx. Vzniká ukládáním lipoproteinů, převážně LDL, do membrán endoteliálních buněk, což vyvolává zánětlivou odpověď vedoucí k tvorbě subendoteliálních arteriosklerotických plátů, zúžení cévní stěny, omezení její pružnosti a následnému sníženému průtoku krve cévou. Arterioskleróza může být příčinou dalších

cévních nemocí, jako je například infarkt myokardu nebo cévní mozková příhoda. Bylo experimentálně dokázáno, že k narušení glykokalyx došlo po podání dávky oxidovaného LDL, následované lokální adhezí krevních destiček. Naopak podání eSOD a katalázy tento efekt vyrušilo, což dokazuje, že ubývání glykokalyx a enzymů v něm přítomných zvyšuje oxidativní stres. Také bylo prokázáno, že na místech s vyšším rizikem arterosklerózy je snižená tloušťka glykokalyx a tudíž snižená ochrana cév. To potvrzuje roli glykokalyx v procesu vzniku a vývoje této choroby. (Reitsma 2007, Vijayagopal 1988)

7. METODY VIZUALIZACE GLYKOKALYX

Přesné a správné zobrazení glykokalyx je klíčovým pro další výzkum. Jedná se například o vizualizaci specifickými fluorescenčními markery, jenž přilnou k některé z jeho složek, a díky kterým jsme schopni glykokalyx detekovat. Bohužel, glykokalyx je velmi citlivý a špatná příprava může vést k jeho narušení nebo dehydrataci, což představuje v dnešní době největší komplikaci při jeho zkoumání. Dosud byly použity ke zobrazení glykokalyx čtyři metody – elektronová mikroskopie, intravitální mikroskopie a mezi přímé metody vizualizace patří konfokální a dvou-fotonová laserová skenovací mikroskopie. Přesto by však bylo vhodné hledat jiné, univerzální, možnosti detekce glykokalyx, neboť každou z těchto metod lze použít jen za určitých podmínek.

(Reitsma 2007)

7.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) patří mezi nejnámější metody zobrazování vůbec. Před rokem 2000 bylo využito barvení „ruthenium red“, kationizovaným feritinem, zlatými koloidy a imunoperoxidázou, později „alcian blue 8GX“ a flourokarbon-glutaraldehydová fixativa. Díky těmto barvením byla zjištěna prvotní tloušťka glykokalyx, a to méně než 100 nm, což se v průběhu dalších let podařilo vyvrátit. TEM je populární metodou stále používanou pro studium glykokalyx, jeho velkou nevýhodou ale je, že může být použit pouze *in vitro*. (Reitsma 2007, Weinbaum 2007)

7.2 Intravitální mikroskopie

Intravitální mikroskopii (IM) byl detekován glykokalyx jako prostor mezi plasmou, značenou fluorescenčním dextranem, a stěnou cévy, zobrazenou světelnou mikroskopií. Glykokalyx tak představuje jakousi zónu prostou červených krvinek a plasmy a jeho tloušťka byla zjištěna následným odečtením průměru sloupce plasmy od průměru lumenu cévy. Mezi IM patří μ -PIV (microparticle image velocimetry) a mikroviskometrie, metody používané pro měření rychlosti průtoku krve cévami. Spolu s EM patří IM mezi nepřímé metody vizualizace glykokalyx a je vhodná pouze pro úzké cévy. (Long 2004, Reitsma 2007, Smith 2003, Weinbaum 2007)

7.3 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Konfokální laserová skenovací mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) patří spolu s dvou-fotonovou k přímým metodám vizualizace glykokalyx, které používají fluorescenčně značené lektiny, vážící se na specifické části GAG řetězců, nebo jiné markery, jako jsou protilátky proti HS, HA a syndekanu-1. I když CLSM mapuje změny koncentrace těchto lektinů v glykokalyx, není bohužel vhodná pro široké cévy, podobně jako IM. (Reitsma 2007)

7.4 Dvou-fotonová laserová skenovací mikroskopie

Dvou-fotonová laserová skenovací mikroskopie (two-photon laser scanning microscopy, TPLSM) funguje na principu excitace fluoroforu a současné absorpce dvou dlouhovlnných červených fotonů. TPLSM představuje ideální techniku vizualizace glykokalyx, z důvodu nízké fototoxicity, dobrého rozlišení, optického skenování a hlubší penetrace do tkáně. Navíc je tato technika vhodná kvůli své univerzálnosti aplikace jak na úzké, tak na široké cévy, a zároveň *in vitro* i *in vivo*. To ji činí nejvhodnější metodou ze všech zde zmíněných a jediným problémem zůstává její dostupnost. (Reitsma 2007)

8. ZÁVĚR

Tato práce představuje shrnutí dosavadních poznatků o složení, struktuře a funkci glykokalyx ve fyziologii a patofyziologii cév a metody jeho zkoumání. Zvláště je zde věnovaná pozornost problematice tloušťky glykokalyx a všem faktorům, které ji podmiňují. Přesto, že neexistuje jednotná tloušťka této vrstvy, bylo vymezeno alespoň rozmezí 0,4 – 4 μm . Další vývoj v této oblasti závisí především na metodách vizualizace glykokalyx, kde je potřeba najít univerzální metodu, použitelnou za všech okolností. Zatím jako nejvhodnější vypadá dvou-fotonová laserová skenovací mikroskopie, ale vzhledem k její dostupnosti se bohužel nedá používat ve velkém měřítku. Výzvou nadále zůstává sloučení biochemické a geometrické struktury glykokalyx. Jako lákavé se jeví i studium glykokalyx v souvislosti s patofyziologií cév, kde může tato citlivá vrstva fungovat jako iniciátor či mediátor různých chorob. To představuje budoucí cíle mé diplomové práce, zaměřující se na interakci glykokalyx s myeloperoxidázou, enzymem uvolňovaným z polymorfonukleárních neutrofilů. Předpokladem je, že kladně nabitá myeloperoxidáza reaguje s negativním glykokalyx a způsobuje tak změnu v jeho složení, čímž ovlivňuje propustnost endoteliálních buněk a zánětlivou reakci.

Na závěr je nutno podotknout, že glykokalyx představuje výzvu v mnoha ohledech, nicméně objasnění dosud neprozkoumaných témat či sporných faktů by mohlo významně zasáhnout do oblasti výzkumu vaskulární patofyziologie.

Seznam zkratek

AT III	antithrombin III
CD62E	CD molekula s funkcí v adhezi (vazba mucinů), exprese na EC
CD62P	CD molekula s funkcí v adhezi (vazba mucinů), expr. na EC, trombocytech
CD99	CD molekula s funkcí v signalizaci
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
CS	chondroitin sulfát
DPAB	husté skupiny periferního aktinu
DS	dermatan sulfát
EC	endoteliální buňky
ecSOD	extracelulární superoxid dismutáza
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
FGF	růstový faktor fibroblastů
GAG	glykosaminoglykan
GlyCAM	adhezní molekula závislá na glykosylaci
GPI	glykosylfosfatidylinositol
HA	kyselina hyaluronová (hyaluronan)
HS	heparan sulfát
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula 1
ICAM-2	intracelulární adhezní molekula 2
IM	intravitální mikroskopie
JAM-1	adhezní molekula těsných spojů 1
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
PECAM-1	adhezní molekula endoteliálních buněk a krevních destiček
PGI ₂	prostacyklin
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TNF- α	faktor nádorové nekrózy
TPLSM	dvou-fotonová laserová skenovací mikroskopie
VCAM-1	adhezní molekula krevních buněk
vWf	von Willebrandův faktor
ZO-1	protein těsných spojů 1

Seznam literatury

- Allen BL, Filla MS, Rapraeger AC. 2001. Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. *J. Cell Biol.* 155:845–858
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α v β 3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J. Exp. Med.* 187:329–339
- Bruehl RE, Springer TA, Bainton DF. 1996. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 44:835–44
- Carey DJ. 1997. Syndecans: multifunctional cell-surface coreceptors. *Biochem. J.* 327(Pt 1):1–16
- Damiano ER, Stace TM. 2002. A mechano-electrochemical model of radial deformation of the capillary glycocalyx. *Biophys. J.* 82:1153–75
- Davies PF. 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* 75:519–560
- Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. 2005. Activated platelets induce Weibel–Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* 106:2334–2339
- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J. Clin. Invest.* 108:1341–1348
- Eardley KS, Cockwell P. 2005. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney International* 68:437–455

Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ. Res.* 93:136–42

Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120:923–34

Henry CB, Duling BR. 1999. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 277:H508–14

Chappell D, Becker BF, Jacob M. 2010. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol* 105:687–701

Chappell, Dörfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. 2009b. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia reperfusion. *SHOCK* 34:133-139

Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker BF. 2009a. The Glycocalyx of the Human Umbilical Vein Endothelial Cell: An Impressive Structure Ex Vivo but Not in Culture. *Circ. Res.* 104:1313-1317

Kansas GS, Saunders KB, Ley K, Zakrzewicz A, Gibson RM, Furie BC, Furie B, Tedder TF. 1994. A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.*124:609–618

Koedam JA, Cramer EM, Briend E, Furie B, Furie BC, Wagner DD. 1992. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J. Cell Biol.* 116:617–625

Laurent TC, Fraser JR. 1992. Hyaluronan. *Faseb. J.* 6:2397–2404

Ley K. 1996. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* 32:733–42

Long DS, Smith ML, Pries AR, Ley K, Damiano ER. 2004. Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10060–65

McGee MP, Liang J. 2001. Regulation of glycosaminoglycan function by osmotic potentials. Measurement of water transfer during antithrombin activation by heparin. *J. Biol. Chem.* 276:49275–82

Nandi A, Estess P, Siegelman MH. 2000. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J. Biol. Chem.* 275:14939–14948

Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O’Leary DH, Genuth S. 2003. Intensive diabetes therapy and carotid intima–media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 348:2294–2303

Platts SH, Duling BR. 2004. Adenosine A3 receptor activation modulates the capillary endothelial glycocalyx. *Circ. Res.* 94:77–82

Potter DR, Damiano ER. 2008. The Hydrodynamically Relevant Endothelial Cell Glycocalyx Observed In Vivo Is Absent In Vitro. *Circ. Res.* 102:770-776

Potter DR, Jiang J, Damiano ER. 2009. The Recovery Time Course of the Endothelial Cell Glycocalyx In Vivo and Its Implications In Vitro. *Circ. Res.* 104:1318-1325

Pries AR, Secomb TW, Jacobs H, Sperandio M, Osterloh K, Gaehtgens P. 1997. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 273:H2272–79

Reitsma S, Slaav DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Physiol* 454:345–359

Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. 2006. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia–reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290:H2247–56

Savery MD, Damiano ER. 2008. The Endothelial Glycocalyx is Hydrodynamically Relevant in Arterioles throughout the Cardiac Cycle. *Biophys. J.* 95:1439–1447

Scott JE, Heatley F. 1999. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96:4850–4855

Secomb TW, Hsu R, Pries AR. 1998. A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 274:H1016–22

Secomb TW, Hsu R, Pries AR. 2001. Motion of red blood cells in a capillary with an endothelial surface layer: effect of flow velocity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281:H629–36

Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. 2003. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophys. J.* 85:637–45

Stace TM, Damiano ER. 2001. An electrochemical model of the transport of charged molecules through the capillary glycocalyx. *Biophys. J.* 80:1670–90

Starling EH. 1896. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *J Physiol* 19:312–326

Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC. 2004. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a “bumper-car” model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:16483–88

Tissot O, Pierres A, Foa C, Delaage M, Bongrand P. 1992. Motion of cells sedimenting on a solid surface in a laminar shear flow. *Biophys. J.* 61:204–15

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. 2005. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* 96:488–500

Vijayagopal P, Srinivasan SR, DalferesER Jr, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. 1988. Effect of low-density lipoproteins on the synthesis and secretion of proteoglycans by human endothelial cells in culture. *Biochem. J.* 255:639–46

Vink H, Duling BR. 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ. Res.* 79:581–89

Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. 2007. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9:121–67

Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC. 2003. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7988–95

Zhao Y, Chien S, Weinbaum S. 2001. Dynamic contact forces on leukocyte microvilli and their penetration of the endothelial glycocalyx. *Biophys. J.* 80:1124–40