

Новые задачи экспериментальной терапии по изучению и развитию отдельных и сочетанных курсов ферментных биоконъюгатов

А.В. МАКСИМЕНКО, А.В. ВАВАЕВА, Ю.С. САХАРОВА, А.В. ВАВАЕВ

Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Меняющиеся условия жизни обусловили формирование, выявление и определение «новых», мало изученных факторов риска сердечно-сосудистых осложнений, в частности аномальных климатических воздействий, актуальности запросов системы здравоохранения на определение механизмов воздействия «новых» факторов риска на организм и разработку оригинальных лечебных подходов. Эффективность последних во многом оказалась связанной с использованием высокомолекулярных соединений, среди которых заметное место заняли ферментные производные. Возникла необходимость разработать новые модели поражения сосудистой системы *in vivo* и последовательно исследовать на них действенность экспериментальной терапии ферментными биоконъюгатами. Для лечения и профилактики нарушений кровообращения представляется перспективным исследование эффектов сочетанного курса производных биокатализаторов (как биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза с нативной или модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазой) на модели поражения сосудов прогипертензивными факторами (ангиотензином II с повышенными концентрациями хлористого натрия), увеличение уровня которых отмечается в периоды аномальных климатических условий. Расширение исследовательских задач обуславливает появление новых научных коллективов, изучающих и разрабатывающих ферментные препараты следующего поколения на новых моделях комбинированных сердечно-сосудистых нарушений.

Ключевые слова: «новые» факторы риска сердечно-сосудистых осложнений, защита сосудистой стенки, эндотелиальный гликокаликс, конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза, гиалуронидаза, модели комбинированного поражения сосудистой системы *in vivo*.

Novel challenges of present-day healthcare with biocatalytic technologies. Enzyme bioconjugates in several and junctive courses of experimental therapy

A.V. MAKSIMENKO, A.V. VAVAEVA, YU.S. SAKHAROVA, A.V. VAVAEV

Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center for Cardiology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

Summary

Altering conditions of life determined the formation, elicitation and establishment of «novel», studied deficiency risk factors of cardiovascular complications, in particular anomalistic climatic effects. This situation specified the growth of topicality for requests from healthcare system in respect to elucidation of action mechanism of «new» risk factors on organism and development of effective medicative approaches. Efficacy of latter was associated mainly with high molecular compounds using, among which the enzyme derivatives preoccupied the observable place. It became important argumentatively to develop the new injury models of vascular system *in vivo* and investigated the efficiency of experimental therapy against their with enzyme bioconjugates. Treatment and prophylaxis of the disturbance of blood circulation are adduced perspective the research of junctive course with biocatalyst derivatives (bienzyme superoxide dismutase-chondroitin sulfate-catalase conjugate with native or chondroitin sulfate modified hyaluronidase) in model of vascular injury with prohypertension factors (angiotensin II and chloride sodium). Enhanced level of these compounds is observed for anomalistic climatic conditions. Widening of research task frontiers determined the appearance here the new scientific collectivities for investigation and development of enzyme derivatives of new generation on new models of cardiovascular injuries *in vivo*.

Key words: «novel» risk factors of cardiovascular complications, vascular wall protection, endothelial glycocalyx, superoxide dismutase chondroitin sulfate-catalase conjugate, hyaluronidase, rat model of combined cardiovascular system injury.

Сведения об авторах:

Максименко Александр Васильевич — д. б. н., проф., вед. научный сотрудник отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская

улица, 15а. E-mail address: alex.v.maks@mail.ru, тел.: +7 (495) 414-60-25; факс: +7 (499) 726-31-16, <https://orcid.org/0000-0002-7431-231X>
Ваваева Анна Владимировна — мл. научный сотрудник отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института

экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ (vavaeva-a-v@yandex.ru)

Сахарова Юлия Сергеевна — лаборант-исследователь отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ (yulka.sakharova@mail.ru)

Ваваев Александр Владимирович — к. б. н., научный сотрудник отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ (vavaev@sportmedicine.ru)

Изменяющиеся условия жизни современного мира способствуют проявлению и определению «новых», недостаточно изученных факторов риска сердечно-сосудистых осложнений [1]. Зарубежные и отечественные эпидемиологические исследования доказательно подтверждают, что во время так называемых волн жары и холода отмечается рост общей и сердечно-сосудистой смертности [2, 3]. Показано, что кардиологические препараты влияют на адаптацию к высоким температурам больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (аномально жаркое лето 2010 года в Москве) [4]. Прием ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента и блокаторов кальциевых каналов связан с меньшим количеством осложнений в период аномальной жары, а с ее худшей переносимостью ассоциировался прием диуретиков, блокаторов рецепторов 1-го типа к ангиотензину II и нитратов. Полученные данные обосновывали постановку современных целей биомедицинских исследований, выделяя актуальность разработки новых моделей комбинированного поражения сердечно-сосудистой системы и апробации на них эффективности экспериментального применения лечебных производных следующего поколения. Складывающаяся ситуация подчеркивала актуальность исследования и установления взаимосвязи между «классическими» и «новыми» факторами риска сердечно-сосудистых осложнений, определения механизма влияния этих факторов на организм и поиска новых терапевтических средств для противодействия и блокирования упомянутых нарушений.

Целью настоящей статьи стала постановка исследовательских задач по разработке новых отдельных ферментных производных или их сочетаний для экспериментальной кардиологической энзимотерапии.

Поиск новых лекарственных средств ферментной природы

Разработка новых лекарств ведется издавна и интенсивно продолжается в настоящее время. Развитие медицинской науки достоверно продемонстрировало эффективность конструирования лекарственных производных на основе высокомолекулярных соединений. Заметное место среди них заняли препараты ферментов благодаря их высокой каталитической активности, чрезвычайной избирательности действия и тонкой чувствительности к изменению условий окружающей среды. Они эффективно вошли в клиническую практику тромболитической терапии, перспективно зарекомендовали себя в исследовании антиоксидантной защиты сосудистой стенки, проявили протекторную активность против поражающего действия ионизирующего излучения [5–7]. Полученные результаты свидетельствовали о значимом лечебном ресурсе ферментных производных.

Разработка моделей комбинированного сосудистого поражения *in vivo*

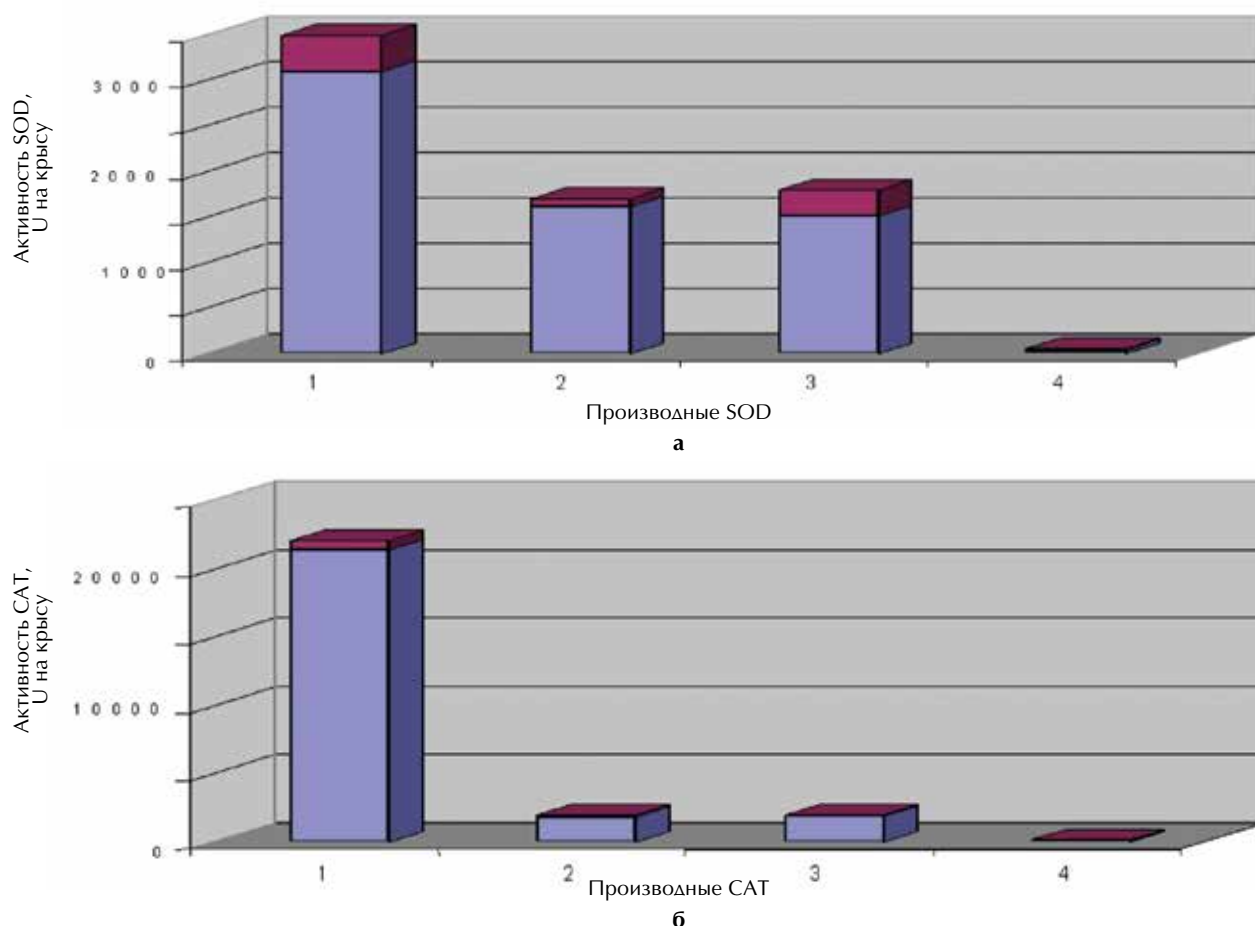
Как отмечалось выше, с развитием глобализации меняются факторы риска сердечно-сосудистых поражений. Среди них становятся актуальными изучение влияния аномальной жары на организм человека и разработка методов защиты населения от ее последствий. С худшей адаптацией к жаре связывались развитие окислительного стресса, меньшая степень снижения артериального давления и скорости распространения пульсовой волны, выраженное повышение уровня Na в плазме крови [8]. Это обосновывало разработку экспериментальных моделей сочетанного сосудистого поражения, связанного с прогипертензивными факторами, характеризующимися повышением артериального давления и концентрации натрия. Практическое осуществление такого подхода вполне может основываться, в частности, на инфузионном введении животным ангиотензина II и хлористого натрия, инициирующих подъем артериального давления. Формирование указанной модели поражения предполагает определение доз ангиотензина II и хлористого натрия, провоцирующих заметное повышение артериального давления у животных с контролем у них частоты сердечных сокращений. Видимо, развитие комбинированного сосудистого поражения (с повышением артериального давления) может быть достигнуто в рамках экспериментов (продолжительностью 48–72 часа), с выполнением нескольких контрольных опытов (по оценке влияния разных концентраций ангиотензина II и хлористого натрия по отдельности и сочетанно) для определения эффективных рабочих концентраций агентов поражения системы кровообращения животных. Такие и другие (как разработка модифицированных ферментных производных нового поколения методами химического и биологического синтеза) трудоемкие, экспериментально сложные, важные задачи ставятся современным здравоохранением перед исследователями в области науки о живом.

Биомедицинское исследование новых терапевтических подходов

Реализация запроса на новые лечебные методы может базироваться, по нашему мнению, на комбинированном/сочетанном применении ферментных средств разного класса. Полученные нами данные указывают на целесообразность использования для антиоксидантной защиты (на сосудистой стенке и в объеме кровотока) ковалентного биферментного конъюгата супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза (СОД-ХС-КАТ) [9] вместе с производными гиалуронидазы, регулирующими состояние эндотелиального гликокаликса [10].

Рисунок 1. Проявление биферментным конъюгатом СОД-ХС-КАТ (на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного обработкой сосуда насыщенным раствором хлористого железа) антитромботического эффекта в дозах на два порядка величин меньше, чем для нативных СОД и КАТ, и на порядок меньших, чем для модифицированных хондроитинсульфатом (ХС) СОД и КАТ или для их смеси (СОД-ХС + КАТ-ХС).

Представлено сравнение интервалов величин оптимальных доз антитромботического действия (приведены наверху диаграммных столбцов и выделены темным цветом) для производных СОД (А) и КАТ (Б) соответственно. Обозначения: 1 — нативный фермент, 2 — ковалентный конъюгат фермента с ХС, 3 — смесь производных СОД-ХС с КАТ-ХС, 4 — биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ.



В СОД-ХС-КАТ гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса хондроитинсульфат (ХС) способствовал увеличению тропности этого конъюгата к очагам поражения сосудистой стенки, в которых уже на ранних этапах развития атеросклероза растет содержание ХС [11]. Сочетание активностей СОД и КАТ не только усиливало их комбинированное антиоксидантное действие (совместно превращающих активные формы кислорода в безопасные продукты), но и благодаря их ковалентному связыванию через ХС вызывало одновременное нахождение биокатализаторов в очаге поражения. Посредством этого достигалась повышенная эффективность действия СОД-ХС-КАТ (в малых дозах) в сравнении с эффектами разнообразных смесей ферментных антиоксидантов (рис. 1) [12]. Эффективность конъюгата СОД-ХС-КАТ продемонстрирована *in vivo* не только при превентивном применении, но и при лечебном режиме (то есть после инициации развития окислительного стресса) [13]. Эти результаты заметно

расширили область потенциального применения ферментного производного СОД-ХС-КАТ, перспективность его тестирования в отношении «новых» факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний.

В качестве двойного защитного слоя сосудистой стенки выступают эндотелий и его гликокаликс [10]. После острых сердечно-сосудистых поражений функциональное восстановление миокарда возможно при достижении значимой реперфузии инфаркт-связанной артерии, как и адекватного уровня микроциркуляции и тканевой перфузии в прилегающих областях [14]. Нарушение микроциркуляции при остром коронарном синдроме у пациентов с отсутствием «оптимальной» реперфузии способствует формированию неблагоприятного прогноза [15].

Нарушения микроциркуляции обусловлены повреждением эндотелиального гликокаликса [16]. Гиалуронидаза контролирует в организме катаболизм одного из основных компонентов эндотелиального гли-

Рисунок 2. Восстановление уровня микроциркуляции крысы (по данным флуометрии) при внутривенном болюсном введении в 1 мл физиологического раствора: 1 — без добавок к нему (контроль), 2 — нативной гиалуронидазы, 3 — модифицированной ХС гиалуронидазы, 4 — свободного ХС, 5 — смеси гиалуронидазы с ХС за 1 минуту до начала 3-часовой ишемии задней конечности крысы с последующей реперфузией (схема 1).

Представленные кривые получены по медианному показателю экспериментальных данных.

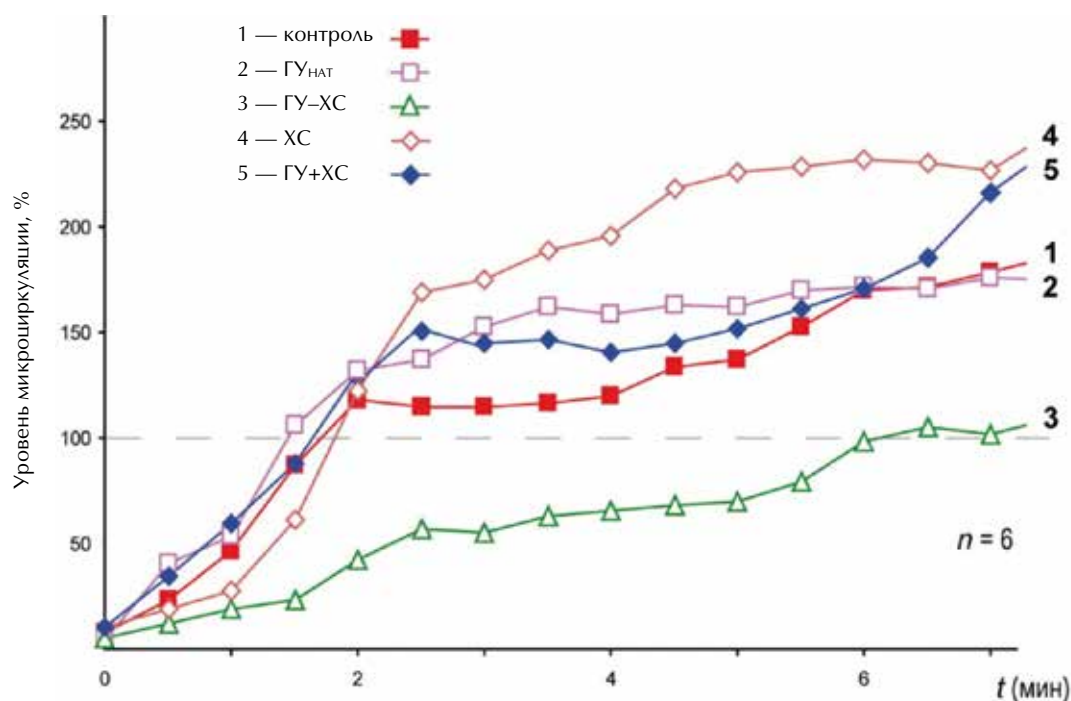
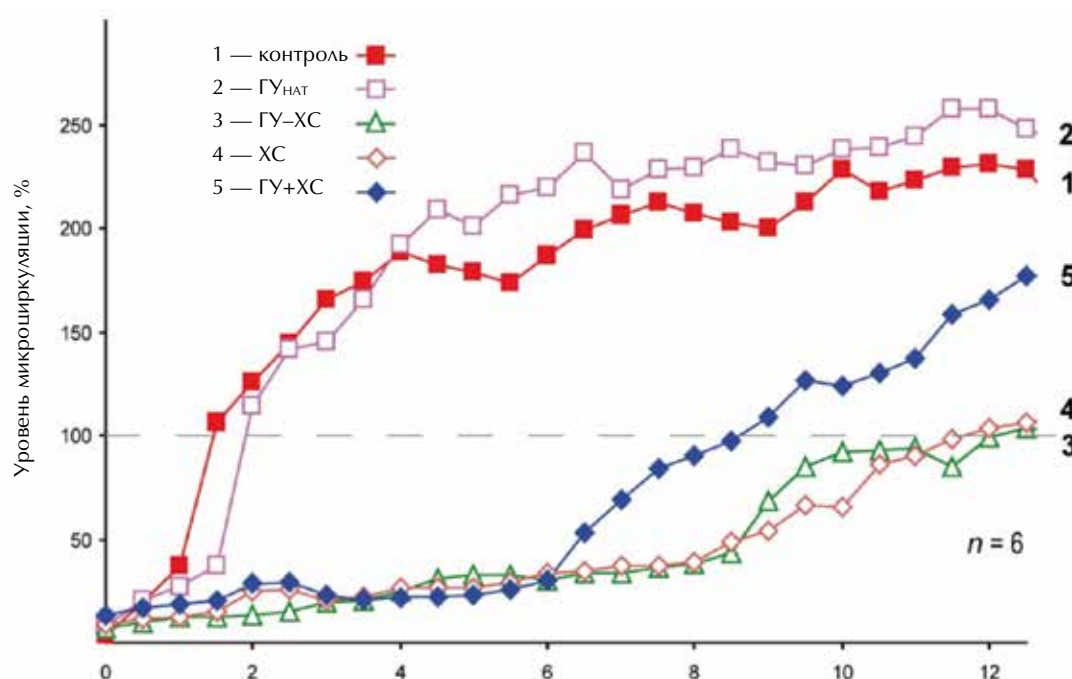


Рисунок 3. Восстановление уровня микроциркуляции крысы в ее задней конечности, по данным лазерной доплеровской флуорометрии, при внутривенном болюсном введении в 1 мл физиологического раствора: 1 — только физиологический раствор (контроль), 2 — нативной гиалуронидазы, 3 — модифицированной ХС гиалуронидазы, 4 — свободного ХС, 5 — смеси гиалуронидазы с ХС за 5 минут до окончания 3-часовой ишемии задней конечности животного с последующей реперфузией (схема 2).

Представленные кривые получены по медианному показателю экспериментальных данных.

Настоящее изучение выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-015-00056) и Министерства здравоохранения Российской Федерации.



кокаликса — гиалуронана, регулируя его состояние. Превентивно введенная гиалуронидаза (даже за 1 минуту до начала 3-часовой ишемии задней конечности крысы (схема 1)) способствовала ускоренному восстановлению уровня исходной микроциркуляции (рис. 2) [10]. Продукты деградации гликокаликса, появляющиеся при ишемии, в противоположность нативному ферменту ингибировали модифицированную ХС-форму гиалуронидазы, задерживая восстановление микроциркуляции. «Острое» введение (за 5 минут до окончания 3-часовой ишемии (схема 2)) производных гиалуронидазы (нативной или модифицированной ХС) подвергает их ударному действию накопленных при ишемии к этому моменту продуктов деградации гликокаликса, в результате чего эффекты сравниваемых производных становятся еще выраженнее (по данным лазерной доплеровской флюорометрии (сравнение рис. 2 и 3)). Действие самого потока крови и нативной гиалуронидазы способствует восстановлению микроциркуляции, а применение модифицированной ХС гиалуронидазы, свободного ХС или его смеси с нативным ферментом его задерживает (рис. 3). По данным вейвлет-анализа экспериментов *in vivo*, выполненных по схеме 2, введение нативной гиалуронидазы демонстрирует достоверность различий ($p < 0,05$, ANOVA Фридмана) в миогенном и нейрогенном диапазонах колебаний. При введении модифицированной ХС гиалуронидазы, свободного ХС или его смеси с гиалуронидазой достоверность различий достигается во всех трех диапазонах: эндотелиальном, нейрогенном и миогенном [10]. Такие данные микроциркуляции свидетельствуют о достоверном росте амплитуды сигнала в миогенном и нейрогенном диапазонах, указывая на снижение жесткости сосудистой стенки и резистентности кровотоку наряду с увеличением метаболической активности эндотелия. Однонаправленность эффектов во всех трех диапазонах колебаний, зарегистрированная на вейвлет-спектрах, носит компенсационный характер нагрузки от введенных экзогенных производных. Влияние потока крови, продемонстрированное в контрольных экспериментах (при продолжительности реперфузии более 900 секунд), нивелировало эффекты этой нагрузки (в виде гидродинамических затруднений кровотоку из-за удержания гликокаликсом ХС и его ковалентных или электростатических комплексов с гиалуронидазой), задерживающей восстановление микроциркуляции. Удержание в реперфузионный период гликокаликсным

покрытием производных модифицированной ХС гиалуронидазы, свободного ХС или его электростатического комплекса с ферментом увеличивало резистентность открывающемуся после ишемии кровотоку и обусловило компенсационный вазодилатирующий вклад миогенного и нейрогенного факторов в развитие реперфузии. «Тормозящее» действие альбумина (лишенного каталитической активности и использованного в обеих схемах эксперимента: введение за 1 минуту до начала ишемии или введение за 5 минут до окончания ишемии) указывает на важность стабильной гиалуронидазной активности для быстрого восстановления адекватного уровня микроциркуляции [10]. Представленные данные свидетельствуют об участии гликокаликса в нарушениях сосудистой системы и актуальности подходов с применением производных гиалуронидазы для контролирования развития «оптимальной» реперфузии у пациентов, вполне возможно затрудненной климатическим влиянием.

Заключение

Новые вызовы здравоохранения обусловлены появлением недостаточно изученных факторов риска сердечно-сосудистых недугов.

Заметное изменение уровней конечных продуктов гликации, нарушений минерального обмена, функций щитовидной железы, приверженности терапии, воздействия изменений климатического и психосоциального характера ассоциируется с меняющимися условиями жизни. Обоснованно становятся актуальными запросы на разработку современных моделей комбинированного поражения сердечно-сосудистой системы. Новые лечебные подходы для таких случаев и выяснение механизма действия «новых» факторов риска сердечно-сосудистых осложнений на организм связаны с меняющимися условиями жизни. Заметное место занимают при этом исследования ферментных лекарственных производных и изучение курсов экспериментальной терапии отдельным или сочетанным применением биокатализаторов. Только встречное движение научных и медицинских работников приведет к прорывным результатам в этом вопросе.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.06.2019

Принята в печать 06.07.2019

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Smirnova M.D., Barinova I.V., Fofanova T.V., Blankova Z.N., Svirida O.N., Ageev F.T., Boytsov S.A. What "new factors should be considered when assessing cardiovascular risk? *Cardiovascular Therapy Preven.* 2018; 17 (6): 77–85. <http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2018-6-77-85>
2. Fouillet A., Rey G., Laurent F., Pavillon G., Bellec S., Guihenneuc-Jouyaux C., Clavel J., Iogla E., Heman D. Excess mortality related to the August 2003 heat wave in France. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2016; 80 (1): 16–24. Doi: 10.1007/s00420-006-0089-4
3. Revich B.A., Shaposhnikov D.A., Podol'naya M.A., Khor'kova T.L., Kvasha E.A. Heat waves in southern cities of European Russia as risk factors for premature mortality. *Studies on Russian Economic Development.* 2015; 26 (2): 142–150. Doi: 10/1134/S1075700715020100
4. Ageev F.T., Smirnova M.D., Svirida O.N., Kuzmina A.E., Shatalina L.S. Impact of the intake of cardiac drugs on adaptation to high temperatures in patients with cardiovascular diseases under the conditions of the abnormally hot summer of 2010. *Ther. Archive.* 2013; 85 (3): 63–69.
5. Maksimenko A.V. Cardiological biopharmaceuticals in the conception of drug targeting delivery: practical results and research perspectives. *Acta Naturae.* 2012; 4 (3): 72–87.
6. Maksimenko A.V. Results and achievements in the engineering of pharmacological enzymes for clinical application. *Med. Res. Arch.* 2018; 6 (1): 1–13. <http://journals.ke-i.org/index.php/mra>
7. Oltarzhevskaja N.D., Krichevsky G.E., Korovina M.A., Shvets V.I., Kubatiev A.A. Methods of delivery of medications for the treatment of oncological diseases. *Biomedical Chemistry: Research and Methods.* 2019; 2 (1): 1. e 00089. Doi: 10.18097/bmcrm00089
8. Smirnova M.D., Ageev F.T., Svirida O.N., Ratova L.G., Kononova G.G., Tikhadze A.K., Lankin V.Z. Health effects of hot summer weather in patients with intermediate and high cardiovascular risk. *Cardiovascular. Ther. Preven.* 2013; 12 (4): 56–61.
9. Maksimenko A.V. Widening and elaboration of consecutive research into therapeutic antioxidant enzyme derivatives. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3075695>
10. Maksimenko A., Turashev A., Fedorovich A., Rogoza A., Tischenko E. Hyaluronidase proof for endothelial glycocalyx as partaker of microcirculation disturbances. *J. Life Sci.* 2013; 7 (2): 171–188. www.davidpublishing.com
11. Yla-Herttuala S., Sumivuori H., Karkola K., Mottonen M., Nikkari T. Glycosaminoglycans in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Lab. Invest.* 1986; 54 (4): 402–407.
12. Maksimenko A.V., Golubykh V.L., Tischenko E.G. The combination of modified antioxidant enzymes for anti-thrombotic protection of the vascular wall: the significance of covalent connection of superoxide dismutase and catalase activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004; 56: 1463–1468. Doi: 10.1211/0022357044544
13. Maksimenko A.V., Vavaeva A.V., Abramov A.A., Vavaev A.V., Lakomkin V.L. Medicative and preventive action of bienzyme superoxide dismutase - chondroitin sulfate-catalase conjugate at endotoxic shock. *Technologies of living systems.* 2014; 11 (2): 35–44.
14. Roe M.T., Ohman E.M., Moa A.C., Christenson R.H., Mahaffey K.W., Granger C.B., Harrington R.A., Califf R.M., Krucoff M.W. Shifting the open-artery hypothesis downstream: the quest for optimal reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37 (1): 9–18.
15. Miura T., Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res. Cardiol.* 2008; 103 (6): 501–513.
16. Rehm M., Bruegger D., Christ F., Conzen P., Tiel M., Jacob M., Chappel D., Stoeckelhuber M., Welsh U., Reichart B., Peter K., Becker B.F. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* 2007; 116 (17): 1896–1906.