

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

© 2007, А. В. Максименко

А. В. Максименко

ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ОКСИДАТИВНОЕ ПОРАЖЕНИЕ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ И ЕЁ ФЕРМЕНТАРНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА

Институт экспериментальной кардиологии, ФГУ Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс Росздора, Москва

Активные формы кислорода оказывают повреждающее действие, как на начальных, так и на последующих стадиях развития сердечно-сосудистой патологии. Оксидативный стресс вносит свой вклад в атерогенную модификацию липопротеидов низкой плотности, появление на люминальной поверхности сосудов липидных отложений, повреждение клеточного гликокаликса, изъязвление и разрыв атеросклеротических бляшек. Большая широта повреждающего действия активных форм кислорода обуславливает необходимость внутри- и внеклеточной антиоксидантной защиты на основе приёмов генной терапии и использования экзогенных биоантиоксидантов. В качестве таковых могут быть использованы модифицированные формы супероксиддисмутазы и каталазы, а также внеклеточная супероксиддисмутаза. Ковалентное связывание через гликозаминогликан сосудистой стенки – хондроитинсульфат — супероксиддисмутазы с каталазой позволило получить биферментный конъюгат, проявляющий антитромботическую активность *in vivo*. Полученные результаты указали на важность присоединения биоантиоксидантного препарата к сосудистой стенке и достижения на ней сопряжения супероксиддисмутазной и каталазной активностей. Использование внеклеточных форм биоантиоксидантов открывает новые перспективы клинических испытаний и разработки высокоэффективных средств защиты сосудистой стенки против атеросклеротических повреждений.

Активные формы кислорода (АФК) в умеренных концентрациях выступают в важной роли медиаторов процессов передачи клеточного сигнала в живом организме, тогда как при повышенных концентрациях они оказывают на организм повреждающее действие [1]. Полагают, что образование АФК, обусловленное “митохондриальным оксидативным стрессом”, может способствовать развитию сахарного диабета и онкологических заболеваний, а АФК, генерируемые благодаря возникновению “воспалительных оксидативных условий”, — развитию атеросклероза и хронического воспаления [1]. Известно, что дисфункция эндотелия сосудов, как ключевой начальный этап развития атеросклероза, возникает благодаря действию комбинации факторов риска (гиперлипидемии, артериальной гипертензии, сахарного диабета и курения) [2], которые связаны с повышенным продуцированием АФК или оксидативным стрессом [3]. Последний является основным механизмом, вовлеченным в патогенез дисфункции эндотелия [2]. Другое повреждение сердечно-сосудистой системы — так называемое “реперфузионное поражение”, также во многом обусловлено действием лавинообразно образующихся АФК [4]. Таким образом, значимость оксидативного стресса для развития многих повреждений сердечно-сосудистой системы (рис. 1) определяется унифицированным механизмом его действия [5].

Потребность во внутри- и внеклеточной антиоксидантной защите

Источником АФК выступают различные ферментативные системы клеток: мембранная NAD(P)H-оксидаза, ксантинооксидаза, липоксигеназа, несвязанная NO-синтаза, митохондрии [1, 3, 5]. Поток избыточно образованных АФК вызывает поражение биомолекул и клеток организма, включая атерогенные изменения. Представления о них со временем менялись [6]. Значимость воспаления для прогрессирования атеросклероза подчеркивалась сходными характеристиками и этапами течения болезней коронарных сосудов, артериальной гипертензии, сердечной недостаточности, инсультов, являющихся осложнениями атеросклероза [5]. Полагают, что стимулы воспаления, такие как окисленные липопротеиды низкой плотности или инфекционные агенты, изменяют эндотелиальную выстилку артерий, делая её более “липкой” благодаря экспрессии молекул адгезии и секреции хемокинов [7]. “Липкий” эндотелий привлекает и задерживает циркулирующие моноциты или другие воспалительные клетки на поверхности артерий. Зафиксированные на ней моноциты проникают через соединение между эндотелиальными клетками и становятся тканевыми макрофагами, которые могут захватывать атерогенные липиды, чтобы образовывать пенные клетки. По мере поступления моноцитов в артериальную стенку

Действие активных форм кислорода



Рис. 1. Схематическое представление унифицированного воздействия оксидативного стресса на развитие патологических процессов.

её поражение развивается от начальной жировой полосы к более зрелой фиброзной бляшке [6, 7].

Против токсичных эффектов АФК клетки используют ферментативные (супероксиддисмутазы, каталаза, глутатионпероксидаза) и неферментативные (глутатион, аскорбат, α -токоферол, β -каротин) механизмы защиты. В норме оба механизма эффективно функционируют, поддерживая гомеостаз. При патофизиологических условиях продуцирование АФК превосходит нейтрализующую способность антиоксидантных систем организма (рис. 2) и в ходе возникающего оксидативного стресса происходит повреждение липидов, белков, ДНК и мембран клеток. Повреждающее действие АФК обусловлено не только потоком АФК, генерируемых клетками, но и возможными внеклеточными источниками АФК в результате протекания реакций Фентона с катионами переходных металлов [5, 8]. Известно, что повышенная концентрация катионов железа как в плазме, так и внутри клеток увеличивает риск развития атеросклероза [9, 10]. Избыток катионов железа может вызывать повреждение органов и тканей благодаря образованию АФК через реакцию Фентона в сосудистой стенке [9].

Проведенные клинические испытания антиоксидантов, в основном из группы витаминов, подразумевают внутриклеточное или внутри- и внеклеточное их действие [5, 11]. Выделения внеклеточной антиоксидантной защиты, как важного фактора сохранения целостности сосудистой стенки, нами в литературе обнаружить не удалось. С учетом противоречивости данных клинических испытаний антиоксидантов [5, 11 – 16], такое акцентирование не выглядит бесполезным. В пользу этого свидетельствует появление на люминальной поверхности сосудов липидных полос, изъязвление и разрыв атеросклеротических бляшек, повреждение клеточного гликокаликса.

Внеклеточная атерогенная модификация липопротеидов низкой плотности

Дисфункция эндотелия и появление липидных отложений на сосудистой стенке являются начальными этапами роста атеросклеротической бляшки [5]. В свою очередь, появление на сосудистой поверхности липидных отложений связано с проникновением через эндотелий в сосудистую стенку окисленных липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Дальнейшая трансформация липидного пятна в фиброзную бляшку связана с внеклеточным превращением окисленных ЛНП в высокоокисленные под действием АФК, продуцируемых макрофагами. Эти клетки захватывают высокоокисленные ЛНП через так называемые сквэдджер-рецепторы, превращаясь в пенные клетки [5]. Таким образом, окисление ЛНП под действием АФК, способствующее появлению атеросклеротических бляшек, может происходить внеклеточно в сосудистой стенке, на люминальной поверхности, а также, возможно, в кровотоке [17]. Следует заметить, что в качестве фактора атерогенной изменчивости ЛНП здесь выступает их окислительная модификация. Объективности ради, стоит упомянуть, что другие данные отводят эту роль десалированию ЛНП, которое может предшествовать их окислению [18, 19]. Вопрос последовательности внеклеточной модификации ЛНП, её вида и размера остается открытым [20].

Разрыв и изъязвление атеросклеротических бляшек под действием активных форм кислорода

Приблизительно 50 % случаев внезапной сердечной смерти обусловлено острым тромбозом [21, 22], 60 % из них связано с разрывом атеросклеротической бляшки, 40 % — с её эрозией. Оклюзирующий тромб является лишь локальным проявлением процессов, лежащих в основе системной патологии сосудов, которая имеет обычно несколько склонных к разрыву или изъ-

язвлению бляшек [23 – 25], что подчеркивает актуальность определения факторов, провоцирующих разрыв и изъязвление бляшек. Стабильность бляшек зависит, в частности, от их протеогликанового состава [21]. Выделяют также локальные (медиаторы воспаления и фиброза, коагуляцию и профиль генов) и системные (реология крови, повышенная коагуляция, системное воспаление, повторяющиеся инфекции) факторы патогенеза разрыва бляшек [25]. Отмечено, что при нестабильной стенокардии продуцирование АФК выше, чем при стабильной стенокардии [26]. Эти результаты показывают, что образование АФК в бляшках коронарных артерий человека может играть опосредованную роль в проявлении острого коронарного синдрома [27]. Действительно, повышенное образования АФК может служить маркером нестабильных бляшек из-за более высокого содержания в них активных макрофагов. Они известны как самые продуктивные источники АФК. Вместе с тем, медиаторами деградации экстрацеллюлярного матрикса и фенотипа сосудистых клеток в патогенезе заболеваний сосудов предстают протеазы [28]. Воздействие ишемия-реперфузия ведет к активации матриксных металлопротеиназ (продуцируемых в зимогенном виде, ММП) в тканях миокарда и плазме крови пациентов [29]. Основной продуцент ММП в плазме — нейтрофилы и тромбоциты, которые могут быть источником АФК. В условиях оксидативного стресса активация ММП может происходить в результате посттрансляционной и оксидативной модификации [29]. Это способствует созданию протеолитического микроокружения в зонах повышенного образования АФК. Возможно, что продуцируемый макрофагами и другими клетками супероксид-радикал индуцирует экспрессию и активацию протеаз, деградирующих матрикс, в том числе ММП-2 и ММП-9 пенистых клеток внутри бляшки [5, 27, 29], которые определяют нестабильность бляшек из-за разрушения ММП их наружной фиброзной “шляпки” [25, 27]. Окисленные под действием АФК ЛНП оказывают дополнительное влияние на апоптоз гладкомышечных и эндотелиальных клеток, приводя к эндотелиальной эрозии и гибели гладкомышечных клеток, что способствует изъязвлению бляшек [27]. По-видимому, АФК выступают в этих условиях как регуляторы стабильности атеросклеротических бляшек.

Повреждение клеточного гликокаликса активными формами кислорода

Гликокаликс сосудов является поверхностным люминальным слоем несущих отрицательный заряд гликопротеинов и гликозаминогликанов, связанных с мембранными белками эндотелия, и играет важную роль в проницаемости кровеносных сосудов. На изолированном сердце было показано, что после 20-минутной ишемии миокарда и 3- или 30-минутной реперфузии гликокаликс подвергается разрушению в начальный момент реперфузии (в зависимости от её длительности различия незначительны) [30]. Действующим началом поражения гликокаликса выступали АФК, в частности, супероксид-анион радикал. Разру-

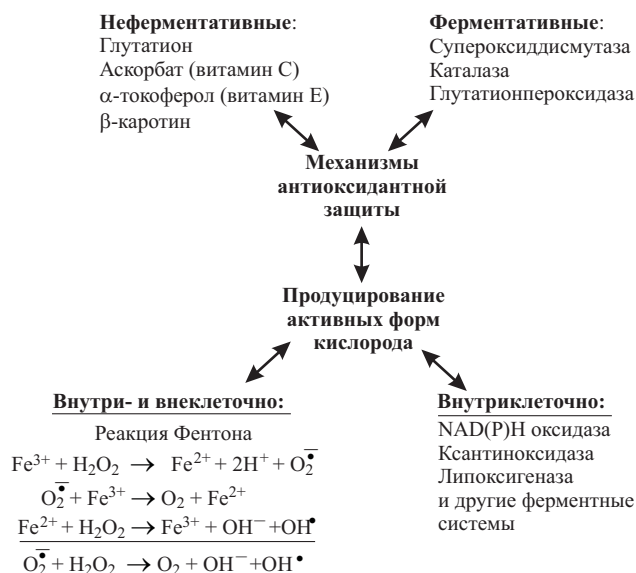
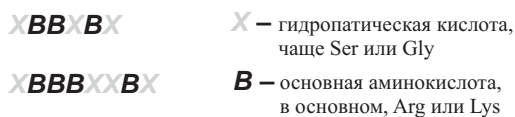


Рис. 2. Условное изображение баланса про- и анти-оксидантных сил.

шение гликокаликса предупреждается превентивным введением антиоксидантного фермента супероксиддисмутаза, подтверждая решающую роль АФК в его повреждении [30, 31]. Таким образом, изменения гликокаликса участвуют в дисфункции миокарда, подвергшегося воздействию ишемии/реперфузии. Электронногистохимическое изучение состояния гликокаликса эндотелия аорты человека показало, что на ранних этапах атерогенеза наблюдается увеличение количества (утолщение) гликокаликса на поверхности эндотелиального монослоя артерий как компенсаторно-приспособительный ответ клетки на поступление избыточного количества атерогенных липидов [32]. Резкое утолщение слоя гликокаликса заметно в области липидной полосы. Гликозаминогликановый компонент гликокаликса проявляет защитную роль против увеличенного поступления атерогенных липопротеидов. С образованием фиброзной бляшки на поздних этапах атерогенеза компенсаторные возможности эндотелия снижаются. Происходит истончение гликокаликса вплоть до его полного исчезновения. Это связано с перестройкой путей транспорта макромолекулярных компонентов плазмы с трансэндотелиального – через апикальную поверхность клетки, на межклеточный – через боковую поверхность эндотелиальных клеток благодаря расширению межклеточных контактов и формированию эндоцитозных везикул вдоль мембран соседних клеток. В зрелых фиброзных бляшках слой гликокаликса также существенно истончается. Защитную функцию от избыточного поступления атерогенных липопротеидов, по-видимому, выполняет образующееся к этому моменту времени соединительнотканное покрытие бляшки [32]. Окисленные ЛНП стимулируют деградацию гликокаликса [33]. Это способствует адгезии лейкоцитов к эндотелию, а также развитию атеросклероза [34]. Количество адгезированных на эндотелии лейкоцитов снижается введением гепарина или гепарансульфата, которые могут при-

Специфичность гликозаминогликан-белковых взаимодействий

Виды гепарин-связывающих центров в белках



Гепариновый пентасахарид

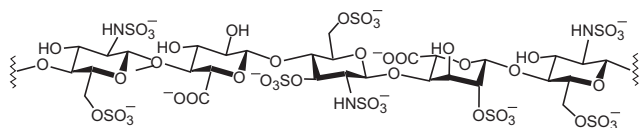


Рис. 3. Состав компонентов белок-гликозаминогликановых взаимодействий.

соединяться к люминальной поверхности после введения окисленных ЛНП.

Специфичность гликозаминогликан-белковых взаимодействий

Эндотелиальный гликокаликс рассматривался изначально как некий общий защитный слой клетки. Лишь недавно стали появляться сообщения о взаимодействии белков с компонентом гликокаликса — гликозаминогликанами. К ним относят гепарансульфат, дерматансульфат, хондроитинсульфат (ХС), гиалуронан. Весьма близок к гепарансульфату гепарин [35]. Широкие исследования определили структурные особенности гепарин/гепарансульфат-связывающих центров белков [35]. Они характеризуются наличием кластеров положительно заряженных основных аминокислот, которые образуют ионные пары с пространственно ориентированными отрицательно заряженными сульфонили карбоксильными группами гликозаминогликановой цепи. Аминокислотные последовательности гепарин-связывающих центров были определены в аполипротеинах В и Е, витронектине, четвертом тромбоцитарном факторе. Они характеризовались двумя видами последовательностей: $XBVXBX$ и $XBVBXXBX$, где В — остаток основной аминокислоты, а X — гидропатической (рис. 3). В роли основных аминокислот выступают аргинин и лизин, а в качестве гидропатических — наиболее часто серин и глицин. Первая из указанных выше последовательностей организуется в β -слой, в котором основные аминокислоты обращены в одну сторону, а гидропатические — в другую, к белковому ядру. Вторая последовательность сворачивается в α -спираль, где основные аминокислоты оказываются на одной стороне спирали. Следует отметить, что белки могут использовать сходные пространственные структурные мотивы для эффективного связывания гепарина, в которых основные аминокислоты оказываются близко пространственно расположенными, но не обязательно близко в аминокислотной последовательности. Относительно обычными предстают кластеры из одной, двух или трёх основных аминокислот (XB_nX , где $n = 1, 2$ или 3), которые разделяются одной

или двумя неосновными аминокислотами (BX_mB , где $m = 1$ или 2) [35].

Гепарин взаимодействует с антитромбином и сериновыми протеазами через низкоаффинное связывание гликозаминогликана с ингибитором, опосредованное уникальной пентасахаридной последовательностью (рис. 3) в гепарине [35]. Она вызывает конформационные изменения антитромбина, усиливающие их взаимодействие. С образованием тройного комплекса антитромбин-гепарин-протеаза (тромбин или фактор X_a) происходит возвращение к низкоаффинному связыванию с освобождением гепарина от ковалентного антитромбин-протеазного комплекса. Гепариновый пентасахарид инициирует связывание с белком, опосредуя их специфическое взаимодействие и выступая в роли белок-связывающего центра. На основании таких данных в качестве антикоагулянтов для лечения венозных тромбозов используются синтетические аналоги антитромбин-связывающей пентасахаридной последовательности, найденной в гепарине, фондапаринукс и идрапаринукс, отличающиеся друг от друга степенью метилирования и сульфатирования [36].

Приведенные результаты демонстрируют возможность специфического взаимодействия белков с гликозаминогликанами, что ранее вовсе не подразумевалось. Это перспективно для направленной внеклеточной защиты сосудистой стенки фармакологическими средствами и выявляет роль гликозаминогликан-связывающих доменов в сосудистой биологии.

Антиоксидантное действие внеклеточной супероксиддисмутазы

Поверхность эндотелия сосудистой стенки является одной из основных мишеней АФК в атерогенезе. Супероксид-анион радикал инициирует цепное лавинообразное образование АФК при оксидативном стрессе. Его антагонистом в организме является фермент супероксиддисмутаза (СОД) [37]. Единственной изоформой СОД, экспрессируемой внеклеточно, оказалась внеклеточная СОД (ВК-СОД) [38]. Она присоединяется к тканям посредством имеющегося в её молекулярном составе гепарин-связывающего домена, специфичного к гепарансульфатпротеогликану, локализованному в гликокаликсе на клеточной поверхности, на плазматической мембране, в экстрацеллюлярном матриксе. Её обозначают как СОД-3 и она является внеклеточной формой Cu/Zn -СОД, представляя собой гомотетрамерный гликопротеин с молекулярной массой около 135 кДа. Другие изоформы СОД — цитозольная Cu/Zn -СОД (СОД-1) и митохондриальная Mn -СОД (СОД-2). На долю СОД-3 приходится 18 – 48 % общей активности СОД в организме [38]. Стенки артерий человека содержат заметные количества ВК-СОД, в отличие от её других изоформ [39]. Вероятно, так формируется защитный антиоксидантный потенциал внеклеточного пространства в кровеносных сосудах. Подтверждением тому служит и обнаружение мутации Arg213Gly в гепарин-связывающем домене ВК-СОД [40]. Она ухудшает сродство фермента к клеточной поверхности и повышает его содержание в

крови, что не способствует поддержанию антиоксидантной защиты сосудистой стенки. В целом, внутрисосудистое распределение ВК-СОД подчеркивает доминирующую линию её антиоксидантной защиты скорее на интерстициальном уровне (мембранная и матриксная поверхности), чем на плазменном.

Содержание ВК-СОД в атеросклеротически пораженной аорте человека существенно снижено по сравнению с непораженным сосудом [41]. Помимо этого, ВК-СОД в атеросклеротических сосудах может быть частично инактивированной [42]. У пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) наблюдается достоверное увеличение сосудистой экспрессии ВК-СОД (оцененной по разнице плазменных концентраций ВК-СОД до и после внутривенной инъекции гепарина) по сравнению с контролем (здоровые люди) [43]. Кроме того, в группе ОИМ более высокий уровень экспрессии ВК-СОД коррелирует достоверно с меньшим размером инфаркта. При нестабильной стенокардии уровень сосудистой экспрессии ВК-СОД достоверно выше, чем у пациентов со стабильной стенокардией в контроле. Экспрессия ВК-СОД (на фоне острого коронарного синдрома) позитивно коррелирует с содержанием в крови общего холестерина и возрастом пациентов. Эти результаты подчеркивают важную защитную функцию ВК-СОД при патологии сердечно-сосудистой системы и свидетельствуют о существовании компенсаторного ответа организма на оксидативный стресс при острых ишемических коронарных событиях [43]. Наряду с повышением уровня связанной с эндотелием ксантиноксидазы (грозящей увеличенным продуцированием АФК) у пациентов с хронической сердечной недостаточностью обнаружено сниженное содержание связанной с эндотелием ВК-СОД [44]. Возможно, такое нарушение сосудистого оксидативного баланса представляет собой один из путей развития дисфункции эндотелия при хронической сердечной недостаточности. В целом, приведенные данные свидетельствуют о важной роли ВК-СОД в механизме сердечно-сосудистой антиоксидантной защиты.

Моделирование *in vivo* защитного действия эндогенной супероксиддисмутазы

Для создания усиленного защитного антиоксидантного потенциала сердечно-сосудистой системы (в виде эндогенного источника ВК-СОД, или Ec-SOD) использовали приёмы генной терапии. Так кДНК человеческой ВК-СОД была клонирована за цитомегаловирусным промотором (CMV) и встроена в репликационно-дефицитный аденовирус (Ad5) [45]. Полученная вирусная конструкция (Ad5/CMV/Ec-SOD) после внутривенного введения кроликам способствует продуцированию высокого уровня ВК-СОД в печени. Перераспределение ВК-СОД в миокард и другие органы вызывалось внутривенной инъекцией гепарина/протамина. После ряда последовательных циклов коронарная окклюзия/реперфузия у кроликов измерялось утолщение стенки левого желудочка в группах контроля (введение конструкции Ad5/CMV/LacZ, где исполь-

зуется локализующийся в ядре репортерный ген LacZ β -галактозидазы) и лечения (введение конструкции Ad5/CMV/Ec-SOD). Оказалось, что утолщение стенки существенно снижено в группе лечения по сравнению с контролем [45]. Результаты свидетельствовали о достоверном ослаблении “оглушения” миокарда (т.е. замедленного восстановления функциональности миокарда после кратковременного периода ишемии /5 – 15 мин/ с наступлением реперфузии, несмотря на отсутствие необратимых тканевых повреждений) в результате генной терапии с ВК-СОД. У кроликов с полчасовой коронарной окклюзией и последующей трехдневной реперфузией указанная генная терапия заметно уменьшает размер зоны инфаркта миокарда [46]. Приведенные данные указывают подходы к эффективной антиоксидантной генной терапии при сердечно-сосудистой патологии [45, 46]. Они были использованы при опосредованном аденовирусном генном переносе ВК-СОД (AdEc-SOD) для воздействия на образование неоинтимы в модели баллонной денудации аорты кроликов (т.е. после удаления баллончиком катетера субэндотелиального слоя на люминальной поверхности сосуда) [47]. Было найдено, что локальный (введение аденовирусной конструкции через катетер) генный перенос в сосудистую стенку снижает размер артериального рестеноза и количество макрофагов в зоне поражения по сравнению с контролем (репортерная конструкция AdLacZ) через две и четыре недели после введения препаратов. Следует заметить, что системное введение AdEc-SOD не оказывает существенного влияния на рестеноз. Успешные данные генной терапии указывают на то, что она может быть полезной для предупреждения гиперплазии интимы после внутрисосудистых манипуляций [47].

Баллонное повреждение правой подвздошной артерии кролика приводит к снижению активности СОД на 7 – 14 день после вмешательства [48]. Внутривенное введение в этот период ВК-СОД (несколько болюсов) компенсирует снижение активности СОД и заметно снижает размер констриктивного ремоделирования. ВК-СОД оказалась полезной для предупреждения негативных последствий ангиопластики [47, 48]. Значимость внеклеточного действия СОД отмечается и в сравнительном изучении размеров “реперфузионного” поражения печени у трансгенных мышей с сверхэкспрессией Cu/Zn-СОД (СОД-1) и у обычных мышей, которым превентивно за 15 мин до начала ишемии внутривенно вводили экзогенные Cu/Zn-СОД или Mn-СОД (СОД-2) [49]. Размер поражения в результате воздействия ишемии и реперфузии оценивали по количеству стационарных лейкоцитов в сосудистых компартментах печени, доли неперфузируемых микрососудов в ней и активности аланинаминотрансферазы в пробах крови. Показано, что не обладающие средством к клеточной поверхности Cu/Zn-СОД и Mn-СОД незначительно снижают размер поражения, в то время как у трансгенных мышей он существенно ниже благодаря внутриклеточной локализации сверхпродуцируемой Cu/Zn-СОД. Только по активности аланинаминотрансферазы в пробах крови мыши дикого типа и

трансгенные были близки друг другу. Наши расчеты [49] показали, что в результате поражения относительное количество стационарных лейкоцитов в сосудистых компартментах печени и доля неперфузируемых микрососудов в ней у трансгенных мышей возрастают в 2,5 – 3,2 раза (по сравнению с соответствующим исходным уровнем), а у мышей дикого типа — в 3,5 – 4,6 раз. Относительное увеличение активности аланинаминотрансферазы составляет, соответственно, 1,4 и 2,1 раза. При сравнении величин этих эффектов заметно вырисовывается защитное внутри- и внеклеточное действие сверхпродуцируемой Cu/Zn-СОД. При введении экзогенных Cu/Zn-СОД и Mn-СОД количество стационарных лейкоцитов и доля неперфузируемых микрососудов в печени увеличивается в 2,9 – 3,7 и 2,5 – 3,3 раза (по сравнению с тем же исходным уровнем у мышей дикого типа) соответственно, а активность аланинаминотрансферазы — в 1,8 раза для обоих препаратов. При сопоставлении эффектов виден заметный вклад в защитное действие внеклеточного функционирования экзогенных СОД, особенно Mn-СОД (СОД-2). Внеклеточная активность СОД складывается из активности фермента в объеме кровотока и в стенке сосудов.

С целью придания Cu/Zn-СОД сродства к эндотелиальной поверхности была получена генноинженерная химерная форма человеческой СОД-1, соединенной через вставку GlyProGly с гепаринсвязывающим доменом ингибитора протеина С [50]. Выделенный бифункциональный белок имеет повышенное сродство к гепарин-сефарозе по сравнению с исходной СОД, сходную с ней каталитическую активность и в два раза увеличенное время удержания в крови мышей. Подобные работы [49, 50] обоснованно ставили задачу разработки лекарственных форм СОД в качестве антиоксидантной защиты при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Подходы к фармакологической модификации Cu/Zn-супероксиддисмутазы в качестве экзогенной антиоксидантной защиты

Наиболее частым приемом экспериментальной антиоксидантной энзимотерапии оказалось использование Cu/Zn-СОД, гомодимерного белка с молекулярной массой ориентировочно 32 кДа (СОД-1). Результаты терапии были противоречивы [51, 52], особенно с применением нативной формы фермента [51, 53]. При всей доступности и широте использования для разрабатываемой энзимотерапии СОД-1 она, очевидно, нуждается в придании сродства к сосудистой стенке для обеспечения устойчивого и достоверного лечебного эффекта.

Одним из первых признаков повреждения стенки сосудов под влиянием АФК является разрушение клеточного гликокаликса, обратно коррелирующего со степенью ингибирования свободно-радикального потока [30, 31]. К тому же, клеточный гликокаликс может связывать на сосудистой поверхности разные белки (без эндоцитоза), создавая их депо на стенке сосуда [35]. Это указывает на реальную возможность поверхностного удержания белков клетками. С помощью ла-

зерного конфокального флюоресцентного микроскопирования показано, что локально введенный после ангиопластики гепарин концентрируется на люминальной поверхности сосудистой стенки [54]. Эти данные прямо подтверждают путь укрепления сосудистого гликокаликса и использование его гликозаминогликанов как векторов к клеточной поверхности [55] для транспортировки и удержания на ней белков. С учетом того, что с возрастом, а ещё интенсивнее с развитием атеросклеротических поражений, в гликокаликсе артерий человека растет содержание ХС [56], этот гликозаминогликан оказывается значимым для придания СОД-1 сродства к зонам риска и поражения на сосудистой стенке. Ковалентное конъюгирование Cu/Zn-СОД с ХС позволило провести сравнительное изучение эффективности антитромботического действия СОД-ХС и нативного фермента, свободного ХС и их простой смеси (СОД + ХС) на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного обработкой сосуда раствором хлористого железа [57]. Об эффективности антитромботического действия перечисленных средств (в сравнении с контролем) судили по времени наступления артериальной окклюзии и массе образующегося тромба. Оказалось, что ковалентный конъюгат СОД-ХС обладает наибольшим антитромботическим эффектом среди всех исследованных производных. Можно полагать, что увеличение антиоксидантного эффекта СОД-ХС по сравнению с СОД обусловлено возросшим сродством ковалентного конъюгата к сосудистой стенке в результате модификации фермента [57]. Такой конъюгат перспективен для защиты сосудистого эндотелия от действия АФК. При этом биохимически целесообразно его сочетанное применение вместе с каталазой, когда оба фермента сопряженно превращают АФК в воду и молекулярный кислород [46, 47, 51 – 53].

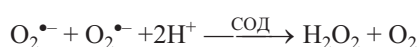
Защита сердечно-сосудистой системы производными каталазы

Каталаза (КАТ) является внутриклеточным тетрамерным белком с молекулярной массой 240 кДа. Её содержание в эндотелиальных и гладкомышечных клетках низкое, что делает их чувствительными к поражению H_2O_2 (одним из видов АФК) [58]. Получение стабильной линии гладкомышечных клеток со сверхэкспрессированием КАТ подтвердило её защитный внутриклеточный эффект как против действия H_2O_2 [59], так и липопероксидов [60]. Повышение внутриклеточного уровня КАТ благодаря интернализации эндотелием конъюгата (биотинилированные антитела против тромбоцитарно-эндотелиальной молекулы клеточной адгезии-1)-стептавидин-КАТ позволило избежать деградации КАТ и обеспечить защиту клеток от повреждающего действия перекиси водорода [61]. Сообщений об экскреции клетками сердечно-сосудистой системы человека КАТ не встречалось и её внеклеточное действие в этих условиях требовало экзогенного источника. На модели нарушений коронарного кровотока собаки продемонстрировано, что в участках левой передней нисходящей коронарной артерии со сте-

нозированным или повреждённым эндотелием введение АФК (инфузия ксантин/ксантинооксидазы или H_2O_2) вызывает выраженные нарушения кровотока. Они устраняются после введения СОД и КАТ отдельно [62] или сочетанно [63]. Нативные СОД и КАТ не влияют на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и/или серотонином [62]. Если же агрегация тромбоцитов вызывалась АДФ и ксантин/ксантинооксидазой или АДФ и H_2O_2 , то СОД или КАТ, её ингибирует [63]. На ишемизированном и реперфузированном изолированном сердце морских свинок показано, что ишемия/реперфузия ослабляет насосную функцию миокарда и при введении гомологичных тромбоцитов способствует их удержанию в коронарных сосудах [64]. Введение СОД уменьшает нарушение функции сердца, но не влияет на содержание тромбоцитов в коронарных сосудах. КАТ оказывает защитное действие в отношении миокарда в стадии ранней реперфузии и снижает адгезию тромбоцитов в коронарных сосудах на начальной и поздней фазе реперфузии [64]. Данные исследований [62 – 64] свидетельствовали, что нативная экзогенная КАТ способна снижать/устранять нарушения кровотока, вызванные АФК, воздействуя на тромбоцитарное звено гомеостаза [65, 66]. При сравнительном изучении антитромботической активности препаратов нативной КАТ, свободного ХС, ковалентного конъюгата КАТ-ХС и их простой смеси КАТ + ХС [67] на модели артериального тромбоза у крыс, вызванного обработкой сосуда раствором хлористого железа, показано, что антитромботическая активность (время наступления окклюзии и масса образующегося тромба) КАТ-ХС и КАТ + ХС сходны между собой и достоверно превосходят таковую нативной КАТ и свободного ХС. Ковалентный конъюгат КАТ-ХС более эффективен в отношении замедления и предупреждения артериальной окклюзии. Малые дозы препарата изменяют плотность образующегося тромба, способствуя длительному поддержанию кровотока [67]. Полученные результаты подчеркивают важность антитромботической защиты сосудистой стенки производными КАТ, эффективность модифицированных форм КАТ и ХС, их влияние на время наступления окклюзии, агрегацию тромбоцитов, морфологию тромба и перспективу комбинированного использования СОД и КАТ при сосудистой патологии.

Использование комбинации супероксиддисмутазы и каталазы для защиты сосудистой стенки в условиях *in vivo*

Необходимость комбинированного использования СОД и КАТ (благодаря биохимической сопряженности катализируемых ими реакций, уравнения которых



Суммарно —



приведены здесь) отмечалась и ранее [45, 51, 53, 68]. Такой подход приводил к получению противоречивых результатов с использованием нативных форм ферментов, что объяснялось, в частности, неспособностью этих биокатализаторов проникать во внутриклеточное пространство после их внутривенного введения [46]. Модифицированные производные СОД-ХС и КАТ-ХС обладают достоверно более высокой антитромботической активностью, чем их компоненты в сходных дозах, введённые индивидуально или в форме смеси [57, 67], хотя комбинация СОД-ХС и КАТ-ХС в этом плане не имеет преимуществ по сравнению с компонентами этой смеси [69]. Возможной причиной этого может быть различное внутрисосудистое поверхностное распределение этих производных в кровотоке, избежать которое в определённой мере может позволить применение ковалентного биферментного конъюгата СОД-КАТ. Сшитые с помощью глутарового альдегида эти биокатализаторы (СОД-КАТ) продемонстрировали на модели ишемии/реперфузии изолированного сердца крысы улучшенные биотерапевтические показатели по сравнению с действием нативной СОД, СОД конъюгированной с альбумином и ковалентного конъюгата СОД с инактивированной КАТ [70]. Эти результаты показали важность одновременного присутствия СОД и КАТ в очаге поражения. Для достижения этого был протестирован ковалентный биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ на модели артериального тромбоза у крыс [69]. Оказалось, что в области оптимального действия производных СОД и КАТ, когда они вызывают максимальный антитромботический эффект, рабочая доза СОД-ХС-КАТ ориентировочно в 50 – 100 раз меньше дозы нативной СОД и в 200 – 400 раз меньше дозы нативной КАТ (по специфической активности ферментных препаратов). Оптимальное соотношение СОД и КАТ в конъюгате СОД-ХС-КАТ составляет 25 – 50 Ед СОД и 55 – 110 Ед КАТ на крысу. Такие небольшие величины эффективных доз указывают на возможность образования самообновляющегося защитного антиоксидантного слоя на клеточной поверхности [52, 57] и на перспективность дальнейшего изучения полученного конъюгата СОД-ХС-КАТ, который достоверно превосходит по антитромботической активности все другие исследованные сочетания (рис. 4). Вместе с тем понятно, что еще многие вопросы требуют своего уточнения, поскольку получены только первые результаты комбинированного действия модифицированных антиоксидантных ферментов *in vivo* [69]. Точный механизм, ответственный за антитромботическое действие различных комбинаций антиоксидантных ферментов, как и биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ, не установлен, но ясно отражает биокаталитическую функцию СОД и КАТ и подразумевает снижение острых сердечно-сосудистых событий благодаря антиоксидантным эффектам рассмотренных производных.

Роль биокаталитической функции антиоксидантных ферментов для защиты сердечно-сосудистой системы следует отметить особо. Так ВК-СОД метаболизирует

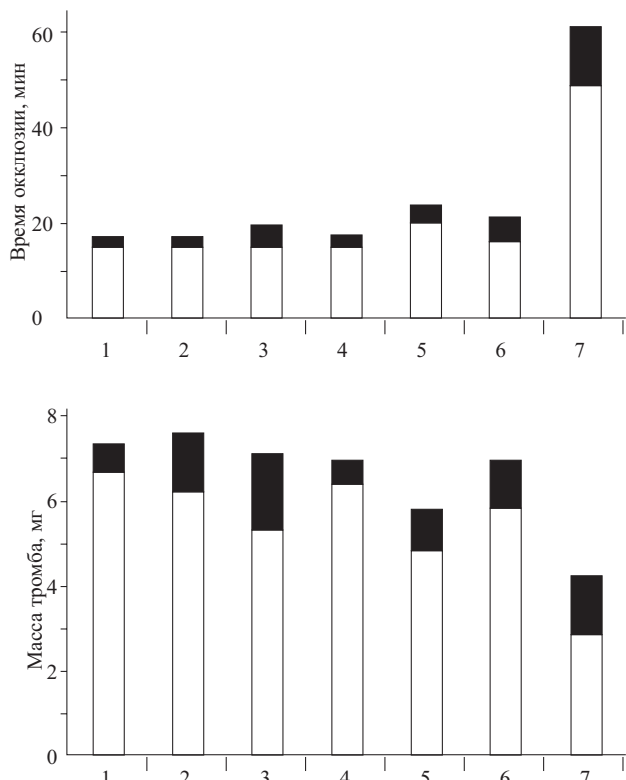


Рис. 4. Антитромботическая активность (интервалы её действия показаны как темные области на вершине диаграммных столбцов) различных комбинаций СОД и КАТ производных и конъюгата СОД-ХС-КАТ. Обозначения: 1 — контроль (введение физиологического раствора), 2 — нативные СОД и КАТ, 3 — нативные СОД и КАТ со свободным ХС, 4 — нативная СОД с производным КАТ-ХС, 5 — производное СОД-ХС с нативной КАТ, 6 — производные СОД-ХС с КАТ-ХС, 7 — биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ. Каждая комбинация была внутривенно инъецирована в одинаковой с конъюгатом СОД-ХС-КАТ дозе, составляющей 37 ± 3 Ед СОД и 80 ± 3 КАТ активности ($n = 6$).

супероксид-анион радикал со скоростью на 4–5 порядков величины больше, чем витамины С или Е [71]. Понятно, что это отражает чрезвычайно высокую эффективность действия биокатализаторов в условиях эксперимента. Константы скорости перекисного окисления липидов ($\sim 0,1 - 1,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$), взаимодействия оксида азота с супероксидом ($\sim 6,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) весьма высоки [71]. СОД конкурирует с оксидом азота за супероксид с константой скорости $(1 - 4) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [71, 72], будучи одним из быстродействующих ферментов, осуществляющих каталитическую реакцию вблизи от диффузионно контролируемой области ($\sim 1,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) превращений. Эффективность антиоксидантного действия убихинона ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) подтверждает, что он, как и витамины С и Е, уступает антиоксидантным ферментам по скорости превращения АФК несколько порядков [71]. Таким образом, по крайней мере, в острых ситуациях (защита NO, нейтрализация АФК при оксидативном взрыве), эффективно противодействовать окислительному поражению могут, вероятно, в достаточной степени лишь ферментные антиоксиданты.

Окислительный стресс, характеризующийся присутствием избыточного количества АФК, выступает как один из основных факторов поражения сердечно-сосудистой системы. Действие АФК проявляется как на начальных, так и на последующих стадиях развития патологии, провоцируя её обострение и превращение хронических процессов в острые (разрыв и изъязвление атеросклеротических бляшек, приступы нестабильной стенокардии и др.). Для предупреждения или ослабления последних, на наш взгляд, целесообразно выделить для изучения и последующей разработки внеклеточные антиоксидантные препараты. Благодаря высокой эффективности в их роли могут оказаться антиоксидантные ферменты со средством к клеточной поверхности (ВК-СОД, модифицированные формы антиоксидантных биокатализаторов) [73]. Источник их появления в организме, вероятно, может быть как внутренним (благодаря приемам генной терапии), так и внешним (после введения экзогенных ферментных средств). Использование экзогенных производных биокатализаторов открывает более короткую дорогу к определению эффективных лечебных форм. Более того, они могут рассматриваться как успешные кандидаты для последующих геннотерапевтических и генноинженерных разработок. Можно также полагать, что выявление уровня внеклеточной защиты антиоксидантами позволит подобрать антиоксидантный препарат смежного внутриклеточного действия [74]. Он, вероятно, должен нормализовать целый набор показателей клеточного метаболизма и будет пригоден для экстренного купирования общего неблагоприятного действия АФК в рамках комплексного лечения патологии. Такие перспективы открывает изучение действия внеклеточных антиоксидантных ферментных производных.

Вместе с тем, использование нативных форм антиоксидантных ферментов для целей экспериментальной и клинической терапии дало противоречивые результаты. Причины этого связывались с недостаточной стабильностью биокатализаторов *in vivo*, коротким временем их пребывания в кровотоке, узкой широтой терапевтического действия таких агентов, их токсичностью и недостаточной универсальностью действия, невысоким накоплением в очаге поражения и т.п.

В значительной мере преодолеть эти ограничения удастся в результате направленной модификации ферментов методами химического и биологического синтеза. При этом весьма ощутимо стремление использовать в качестве модификаторов вещества с полезной биологической активностью.

Сравнительное изучение антитромботической активности производных СОД и КАТ *in vivo* обнаружило наилучшую эффективность ковалентного биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ. Это производное проявляло антитромботическую активность в дозах, на два порядка меньших, чем нативные биокатализаторы, и на порядок меньше, чем СОД-ХС и КАТ-ХС. Отмеченные результаты указывают на важность присоеди-

нения ферментных производных к сосудистой поверхности и реализации сопряженного каталитического действия обоих названных ферментов. Ковалентный биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ предстает потенциальным антитромботическим средством комбинированного антиоксидантного действия.

Разработка препаратов такого рода ставит много сопутствующих проблем, связанных с изучением влияния ферментных производных на морфологию тромба, агрегацию тромбоцитов, поведение клеток сосудистой стенки, параметры доклинических испытаний.

Автор искренне признателен за поддержку настоящего направления исследований, ценные дискуссии и помощь в работе академику Е. И. Чазову, чл.-корр. РАН В. Н. Смирнову, чл.-корр. РАМН В. В. Кухарчуку, профессорам КардиоЦентра В. З. Ланкину и Е. В. Арзамасцеву.

Представленная работа частично финансировалась из средств Министерства здравоохранения и социального развития, Министерства образования и науки Российской Федерации и РФФИ (гранты 06-04-08002-офи и 06-08-00011).

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Dröge, *Physiol. Rev.*, **82**(1), 47 – 95 (2002).
2. P. O. Bonetti, L. O. Lerman, and A. Lerman, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**(2), 168 – 175 (2003).
3. H. Cai and D. G. Harrison, *Circ. Res.*, **87**(10), 840 – 844 (2000).
4. G. Ambrosio and I. Tritto, *Eur. Heart J.*, **4**(Suppl. B), B28 – B30 (2002).
5. N. R. Madamanchi, Z. S. Hakim, and M. S. Runge, *J. Thromb. Haemost.*, **3**(2), 254 – 267 (2005).
6. E. T. Yeh, H. V. Anderson, V. Pasceri, and J. T. Willerson, *Circulation*, **104**(9), 974 – 975 (2001).
7. P. Libby, P. M. Ridker, and A. Maseri, *Circulation*, **105**(9), 1135 – 1143 (2002).
8. B. Halliwell, and J. M. Gutteridge, *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**(2), 501 – 514 (1986).
9. S. M. Day, D. Duquaine, L. V. Mundada, et al., *Circulation*, **107**(20), 2601 – 2606 (2003).
10. A. E. R. Kartikasari, N. A. Georgiou, F. L. J. Visseren, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(12), 2257 – 2262 (2004).
11. T. Münzel and J. F. Keaney, Jr., *Circulation*, **104**(13), 1571 – 1574 (2001).
12. F. Violi, L. Loffredo, L. Musella, and A. Marcocchia, *Heart*, **90**(6), 598 – 602 (2004).
13. I. Jialal, and S. Devaraj, *Circulation*, **107**(7), 926 – 928 (2003).
14. B. G. Brown, M. C. Cheung, A. C. Lee, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**(10), 1535 – 1546 (2002).
15. E. Niki, and N. Noguchi, *Mol. Cell. Biochem.*, **234/235**(1 – 2), 19 – 25 (2002).
16. J. L. Mehta, and J. Mehta, *Cardiol. Rev.*, **7**(1), 56 – 61 (1999).
17. S. Kayo, M. Ohsawa, S. Ehara, et al., *Am. Heart J.*, **148**(5), 818 – 825 (2004).
18. V. V. Tertov, V. V. Kaplun, I. A. Sobenin, et al., *Atherosclerosis*, **159**(1), 103 – 105 (2001).
19. J. S. Millar, *Atherosclerosis*, **154**(1), 1 – 13 (2001).
20. V. V. Tertov, *Angiol. Vasc. Surgery*, **5**(Suppl.), 218 – 240 (1999).
21. F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**(10), 1642 – 1648 (2002).
22. R. Virmani, F. D. Kolodgie, A. P. Burke, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**(5), 1262 – 1275 (2000).
23. M. Madjid, A. Zarrabi, S. Litovsky, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(10), 1775 – 1782 (2004).
24. G. Rioufol, G. Finet, I. Ginon, et al., *Circulation*, **106**(7), 804 – 808 (2002).
25. E. Lutgens, R. J. van Suylen, B. C. Faber, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**(12), 2123 – 2130 (2003).
26. H. Azumi, N. Inoue, Y. Ohashi, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**(11), 1838 – 1844 (2002).
27. K. M. Channon, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**(11), 1751 – 1752 (2002).
28. T. N. Wight, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**(1), 12 – 14 (2005).
29. M. M. Lalu, E. Pasini, C. J. Schulze, et al., *Eur. Heart J.*, **26**(1), 27 – 35 (2005).
30. E. Czarnowska, and E. Karwatowska-Prokopczuk, *Basic Res. Cardiol.*, **90**(5), 357 – 364 (1995).
31. A. Beresewicz, E. Czarnowska, and M. Maczewski, *Mol. Cell. Biochem.*, **186**(1 – 2), 87 – 97 (1998).
32. E. M. Tararak, and G. K. Sukhova, *Angiol. Vasc. Surgery*, **5**(Suppl.), 204 – 217 (1999).
33. H. Vink, A. A. Constantinescu, and J. A. E. Spaan, *Circulation*, **101**(13), 1500 – 1502 (2000).
34. A. A. Constantinescu, H. Vink, and J. A. E. Spaan, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**(9), 1541 – 1547 (2003).
35. E. M. Munoz, and R. J. Linhardt, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(9), 1549 – 1557 (2004).
36. J. I. Weitz, *Circulation*, **110**(Suppl I), I19 – I26 (2004).
37. J. M. McCord, and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**(22), 6049 – 6055 (1969).
38. F. M. Faraci, and S. P. Didion, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(8), 1367 – 1373 (2004).
39. P. Stralin, K. Karlsson, B. O. Johansson, and S. L. Marklund, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**(11), 2032 – 2036 (1995).
40. T. Adachi, H. Yamada, Y. Yamada, et al., *Biochem. J.*, **313**, 235 – 239 (1996).
41. J. S. Luoma, P. Stralin, S. L. Marklund, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**(2), 157 – 167 (1998).
42. H. U. Hink, N. Santanam, S. Dikalov, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**(9), 1402 – 1408 (2002).
43. M. Horiuchi, M. Tsutsui, H. Tasaki, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(1), 106 – 111 (2004).
44. U. Landmesser, S. Spiekermann, S. Dikalov, et al., *Circulation*, **106**(24), 3073 – 3078 (2002).
45. Q. Li, R. Bolli, Y. Qiu, et al., *Circulation*, **98**(14), 1438 – 1448 (1998).
46. Q. Li, R. Bolli, Y. Qiu, et al., *Circulation*, **103**(14), 1893 – 1898 (2001).
47. M. O. Laukkanen, A. Kivela, T. Rissanen, et al., *Circulation*, **106**(15), 1999 – 2003 (2002).
48. P. F. Leite, A. Danilovic, P. Moriel, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**(12), 2197 – 2202 (2003).
49. Y. Horie, R. Wolf, S. C. Flores, et al., *Circ. Res.*, **83**(7), 691 – 696 (1998).
50. M. Boissinot, L. A. Kuhn, P. Lee, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**(1), 250 – 256 (1993).
51. L. H. Opie, *Circulation*, **80**(4), 1049 – 1062 (1998).
52. A. V. Maksimenko, *Curr. Pharm. Design*, **11**, 212 – 222 (2005).
53. R. A. Kloner, K. Przyklenk, and P. Whittaker, *Circulation*, **80**(5), 1115 – 1127 (1989).
54. T. Tomaru, Y. Fujimori, T. Morita, et al., *Jpn. Circ. J.*, **60**(12), 981 – 992 (1996).
55. M. Kaplan, K. J. Williams, H. Mandel, and M. Aviram, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**(4), 542 – 553 (1998).
56. S. Yla-Herttuala, H. Sumuivuori, K. Karkola, et al., *Lab. Invest.*, **54**(4), 402 – 407 (1986).
57. A. V. Maksimenko, E. G. Tischenko, and V. L. Golubykh, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **13**(6), 479 – 484 (1999).
58. M. Shingu, K. Yoshioka, M. Nobunaga, and K. Yoshida, *Inflammation*, **9**(3), 309 – 320 (1985).
59. M. R. Brown, F. J. Miller, Jr., W. G. Li, et al., *Circ. Res.*, **85**(6), 524 – 533 (1999).
60. N. Santanam, N. Auge, M. Zhou, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**(8), 1912 – 1917 (1999).

61. V. R. Muzykantov, M. Christofidou-Solomidou, I. Balyasnikova, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(5), 2379 – 2384 (1999).
62. S. K. Yao, J. C. Ober, A. Gonenne, et al., *Circ. Res.*, **73**(5), 952 – 967 (1993).
63. H. Ikeda, Y. Koga, T. Oda, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **24**(7), 1749 – 1756 (1994).
64. C. Seligmann, M. Schimmer, T. Leitsch, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **29**(12), 1244 – 1251 (2000).
65. L. Iuliano, A. R. Colavita, R. Leo, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **22**(6), 999 – 1006 (1997).
66. F. Krotz, H. Y. Sohn, and U. Pohl, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(11), 1988 – 1996 (2004).
67. A. V. Maksimenko, V. L. Golubykh, and E. G. Tischenko, *Metab. Eng.*, **5**(3), 177 – 182 (2003).
68. R. Bolli, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **5**(Suppl 2), 249 – 268 (1991).
69. A. V. Maksimenko, V. L. Golubykh, and E. G. Tischenko, *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**(11), 1463 – 1468 (2004).
70. G. D. Mao, P. D. Thomas, G. D. Lopaschuk, and M. J. Poznansky, *J. Biol. Chem.*, **268**(1), 416 – 420 (1993).
71. U. Landmesser, and H. Drexler, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**(9), 1367 – 1368 (2002).
72. M. S. Wolin, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**(6), 1430 – 1442 (2000).
73. A. V. Maksimenko, *Med. Sci. Monit.*, **8**(1), RA13 – RA21 (2002).
74. N. R. Madamanchi, A. Vendrov, and M. S. Runge, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**(1), 29 – 38 (2005).

Поступила 24.11.05

EXTRACELLULAR OXIDATIVE DAMAGE OF VASCULAR WALLS AND THEIR PROTECTION USING ANTIOXIDANT ENZYMES

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

Reactive oxygen species damage the blood vessel walls in both the initial and subsequent stages of vascular pathology. The oxidative stress contributes to the atherogenic modification of low-density lipoproteins, the development of lipid streaks on the luminal surface, the disturbance of glycocalyx, and the ulceration and rupture of atherosclerotic plaques. Such a broad range of damaging activity implies the need for both intra- and extracellular protection of vascular walls, which can be realized by a combined use of gene therapy and exogenous biological antioxidants. Recent *in vivo* studies have shown that modified superoxide dismutase (SOD) and catalase as well as extracellular SOD (an enzyme that employs the specificity of glycosaminoglycan – protein interactions) can be effectively used as antioxidant protectors. Covalent binding of SOD to catalase via the vascular wall glycosaminoglycan (chondroitin sulfate) leads to the formation of a bienzyme conjugate, which exhibits more pronounced antithrombotic activity *in vivo* in comparison to several other SOD and catalase derivatives. These results point to the importance of the attachment of bioantioxidants to the vascular wall and the conjugation of SOD and catalase activities on this surface. Extracellular bioantioxidants have good prospects for the development of highly effective protectors of vascular walls against oxidative damage in the framework of a complex therapy of cardiovascular injury.