

А.В. Максименко, А.В. Ваваева, А.А. Абрамов, А.А. Тимошин, М.А. Звягинцева, В.Л. Лакомкин

## НАПРАВЛЕНИЯ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА АНТИОКСИДАНТНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ *IN VIVO*

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

Развитие эндотоксического шока у крыс, индуцированного введением бактериального липополисахарида, сопровождалось окислительным стрессом и повышением уровня NO в печени, легких, почках, сердце животных. Введение в лечебном режиме антиоксидантного конъюгата супероксиддисмутазы – хондроитинсульфата – каталазы (СОД-ХС-КАТ) значимо не меняло эти показатели, а по изменению содержания в крови мочевины и креатинина оказывало защитное действие на функцию почек.

**Ключевые слова:** липополисахарид, эндотоксический шок, окислительный стресс, антиоксиданты, биферментный конъюгат супероксиддисмутазы – хондроитинсульфата – каталазы, NO-зависимое и NO-независимое защитное действие

## PROTECTIVE ACTION OF BIENZYME CONJUGATE OF ANTIOXIDANT BIOCATALYSTS *IN VIVO*

A.V. Maksimenko, A.V. Vavaeva, A.A. Abramov, A.A. Timoshin, M.A. Zvyagintseva,  
V.L. Lakomkin

Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Endotoxin shock in rats led to intravenous bolus of bacterial lipopolysaccharide (LPS) was accompanied by oxidative stress and increase of NO level in livers, lungs, kidneys, hearts of animals. The intravenous administration of bienzyme superoxide dismutase – chondroitin sulphate – catalase conjugate (SOD-CHS-CAT) showed its anti-endotoxemia action in rats at preventive (before initiation of injury) and therapeutic (after start of injury) application during cytokine phase of injury and influence on further stages of the damage. The injection of antioxidant SOD-CHS-CAT conjugate in a therapeutic regime did not demonstrate significant alterations of NO level in livers, lungs, kidneys, hearts of rats (as compared to indices of the rat group with LPS action only) and displayed protective action on the kidney function by altered urea and creatinine in blood. The therapeutic effect of SOD-CHS-CAT was demonstrated by increase in organism viability. The effects of intravenous injection of SOD-CHS-CAT in a rat model of endotoxin shock showed a variety in the activity of this conjugate in addition to prevention of NO conversion in peroxynitrite upon interaction with  $O_2^-$  superoxide radical. The results of accelerated normalization of arterial blood pressure and heart rate, a significant decrease in rat lethality because of using SOD-CHS-CAT conjugate indicate the importance of the determination of action mechanism of the cardiovascular injury models associated with other vasoactive agents besides NO. The further research of vascular damage pathogenesis and evaluation of its role in oxidative stress (time and place) are of paramount importance.

**Key words:** lipopolysaccharide, endotoxin shock, oxidative stress, antioxidants, bienzyme superoxide dismutase – chondroitin sulfate – catalase conjugate

### ВВЕДЕНИЕ

Успехи лечения антиоксидантами пока заметно уступают достижениям биомедицинских исследований. Такое положение обуславливает в частности известный скептицизм клиницистов в отношении антиоксидантной терапии. Современное развитие клинических [7, 9, 13, 14] и экспериментальных [8, 11, 12, 15] изысканий вызвало заметное сокращение отмеченного выше разрыва мнений. Полученные результаты способствовали обоснованному формированию антиоксидантной терапии [11, 12, 14]. Одним из её потенциальных эффективных средств стали антиоксидантные ферменты, совершенствование форм которых ускоряет развитие и повышает действенность антиоксидантного лечения [11, 12]. Модификация антиоксидантных биокатализаторов увеличивает их биодоступность, уменьшает величину эффективной дозы, повышает результативность терапии [1, 2, 8, 9, 11, 12]. Такие эффекты были выявлены в ходе последовательного изучения биферментного конъюгата супероксиддисмутазы – хондроитинсульфата – каталазы (СОД-ХС-КАТ) [1, 3, 11, 12]. Накопленные данные

обосновали и указали актуальность исследования механизмов защиты производным СОД-ХС-КАТ органов животных при развитии у них окислительного стресса и выяснения природы наблюдаемых повреждений по биохимическим показателям крови. Это и стало целью настоящего изыскания.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сравнительное биомедицинское изучение было выполнено на модели эндотоксического шока у крыс, индуцированного внутривенным болюсом им бактериального липополисахарида (ЛПС) из *Salmonella enterica* serotype Typhimurium в дозе 15 мг/кг. Конъюгат СОД-ХС-КАТ (3 мг/мл) болюсно вводили через 20 минут после инъекции ЛПС (лечебный режим введения). Работа проводилась на 64 крысах-самцах линии Sprague Dawley весом  $323 \pm 8$  г. Манипуляции с крысами проводились под золотильным наркозом. Для сравнения полученных данных формировались группы крыс – группа интактных животных (без воздействий, контроль); крысы, которым вводился СОД-ХС-КАТ (крысы с СОД-ХС-КАТ); крысы, которым

вводился ЛПС (крысы с ЛПС); крысы после ЛПС болюс СОД-ХС-КАТ (крысы с ЛПС и СОД-ХС-КАТ). Протокол работы с крысами соответствовал «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» по согласованию с Этическим комитетом ФГБУ РКНПК МЗ РФ.

Содержание NO в органах крыс определялось с помощью липофильной спиновой ловушки на основе комплексов ионов железа и диэтилтиокарбамата (Fe-DETC) с регистрацией образующихся спиновых аддуктов с помощью ЭПР-спектроскопии (спектрометр ЭПР X-диапазона (Varian, США), модель E-109E) в области  $g = 2,03$ . Регистрация уровня NO в органах осуществлялась через 2, 4, 6 часов после введения ЛПС.

Биохимическое исследование проб крови (содержание мочевины, общего белка, глюкозы, креатинина, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), общего билирубина, триглицеридов, холестерина) было выполнено на анализаторе Targa-2000 (Италия) с помощью наборов ЗАО «Диакон-ДС» (Россия) «DiaSys» (Германия).

Сравнение данных экспериментальных и контрольной групп проводили с применением двухстороннего критерия Стьюдента для оценки статистической значимости полученных различий ( $p < 0,05$ ). Если групп сравнения было более двух, применяли метод ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 6 часов после введения ЛПС наблюдали рост содержания спиновых аддуктов NO (рис. 1). Через 4 часа увеличение содержания NO прекращалось, а максимальное повышение отмечалось в печени крыс. В легких и почках крыс уровень NO оставался повышенным.

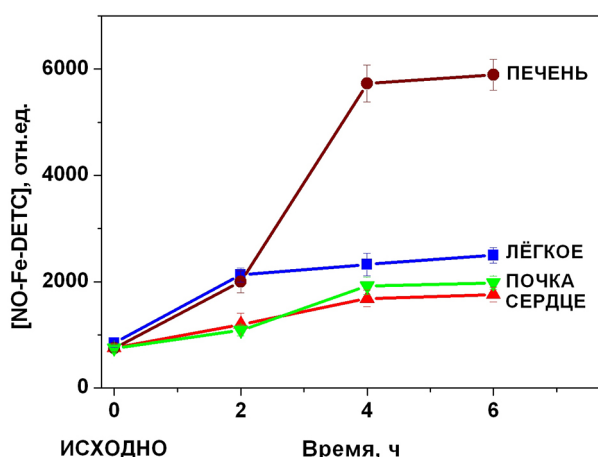


Рис. 1. Содержание спиновых аддуктов NO-Fe-DETC в органах крыс в течение 2, 4 и 6 часов после болюсного введения ЛПС (в относительных единицах от начального уровня).

На рисунке 2 представлены результаты анализа уровня общего NO (свободного и связанного), соответствующего трем экспериментальным группам (контроль; группа с ЛПС; группа с ЛПС и СОД-ХС-КАТ) на 6-й час эксперимента. В результате введения

конъюгата СОД-ХС-КАТ значимых изменений уровня NO не наблюдалось (между группами с ЛПС и ЛПС с СОД-ХС-КАТ). В печени животных группы ЛПС с СОД-ХС-КАТ уровень NO увеличивался (хотя и незначимо) (рис. 2). Действие СОД-ХС-КАТ, возможно, заключалось в перехвате активных форм кислорода: препятствуя и затрудняя образование пероксинитрита, в то же время он не менял активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS).

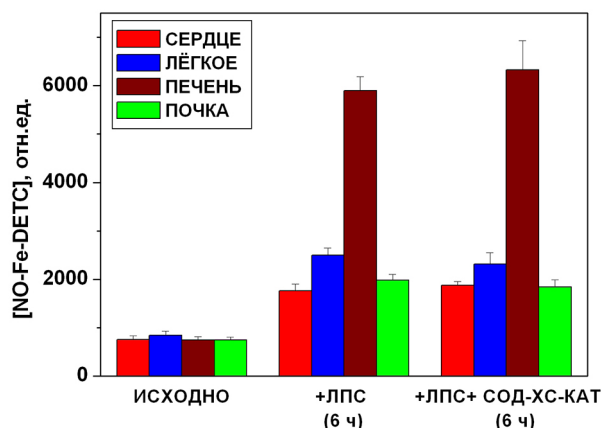


Рис. 2. Уровень спиновых аддуктов NO-Fe-DETC (в относительных единицах от начального уровня) в пробах тканей органов крыс в исходном состоянии (контроль) и через 6 часов после введения ЛПС или ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ.

Введение конъюгата СОД-ХС-КАТ снижало концентрацию в крови мочевины и креатинина, активность щелочной фосфатазы, свидетельствуя о благоприятном воздействии биферментного конъюгата на почки. Холестерин и триглицериды увеличивались незначительно, а подъем АСТ был более существенным.

Для группы крыс с ЛПС отмечалось значимое повышение на 6-й час эксперимента содержания мочевины, креатинина, а также падение АЛТ, что свидетельствовало о снижении выводящей функции почек. Значимое повышение показателей холестерина и триглицеридов может отражать нарушения функции печени. Окислительный стресс, вызванный введением ЛПС, вызывал нарушение работы внутренних органов (печени, почек, поджелудочной железы), подтвержденное повышением содержанием в крови АСТ, креатинина, билирубина. Такие изменения могли приводить к летальному исходу животных в течение суток [4].

Введение после ЛПС конъюгата СОД-ХС-КАТ существенно снижало уровни содержания мочевины и креатинина в крови (поддерживая функцию почек при эндотоксическом шоке). На показатели функции печени эффект был неоднозначным (уровни АЛТ и триглицеридов заметно возрастали, а концентрация холестерина и активность щелочной фосфатазы снижались).

Возмущающее действие ЛПС смягчается введением конъюгата СОД-ХС-КАТ (снижение показателей мочевины и креатинина). Это демонстрирует защитный эффект конъюгата на функцию почек. Многообразные изменения АСТ, триглицеридов (оба показателя

повышаются), холестерина и щелочной фосфатазы (оба уровня снижаются) затрудняют оценку влияния СОД-ХС-КАТ на функцию печени. Возможно, для этого требуется отдельное изучение, а выяснение NO-независимых защитных эффектов и механизма действия биферментного конъюгата нуждается в апробации на моделях поражения другого типа.

Следует заметить, что контролирование уровня пероксинитрита не является единственным направлением лечебного действия. На используемой модели эндотоксического шока у крыс конъюгат СОД-ХС-КАТ, введенный в лечебном режиме после введения ЛПС, значительно снижал показатель суточной летальности животных в сравнении с контролем [4]. Заметно отсутствие значимых отличий уровня NO в группах крыс с ЛПС и ЛПС с СОД-ХС-КАТ (рис. 2). Совместно указанные данные свидетельствуют о существовании других механизмов протекторного действия (вероятно, реализуемых NO-независимым путем [5, 6, 10]) производного СОД-ХС-КАТ, помимо предохранения NO от превращения в пероксинитрит при взаимодействии с супероксид-радикалом. Полученные экспериментальные результаты обосновывают целесообразность последовательного изучения механизма защитного действия биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ.

Представленное исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-04-03584) и Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Максименко А.В. Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы // *Acta Naturae*. – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 76–86.
2. Maksimenko AV (2012). Cardiological biopharmaceuticals in the conception of drug targeting delivery: practical results and research perspectives [Kardiologicheskie biofarmatsevtiki v kontseptsii napravlennoogo transporta lekarstv: prakticheskie rezul'taty i issledovatel'skie perspektivy]. *Acta Naturae*, 4 (3), 72–82.
3. Максименко А.В., Ваваев А.В., Бурячковская Л.И., Мох В.П., Учитель И.А., Лакомкин В.Л., Капелько В.И., Тищенко Е.Г. Биофармакология ферментных конъюгатов: вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза // *Acta Naturae*. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 90–103.
4. Maksimenko AV, Vavaev AV, Buryachkovskaya LI, Mokh VP, Uchitel IA, Lakomkin VL, Kapelko VI, Tishchenko EG (2010). Biopharmacology of enzyme conjugates: vasoprotective activity of supramolecular superoxide dismutase-chondroitin sulfate-catalase derivative [Biofarmakologiya fermentnykh kon'yugatov: vazoprotekornaya aktivnost' supramolekulyarnogo proizvodnogo superoksiddismutaza-khondroitinsul'fat-katalaza]. *Acta Naturae*, 2 (4), 82–94.
5. Максименко А.В., Ваваева А.В., Абрамов А.А., Ваваев А.В., Лакомкин В.Л. Лечебное и превентивное действие биферментного препарата супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза при эндотоксическом шоке // *Технологии живых систем*. – 2014. – Т. 11, № 2. – С. 35–44.
6. Maksimenko AV, Vavaeva AV, Abramov AA, Vavaev AV, Lakomkin VL (2014). Therapeutic and preventive action of bienzime superoxide dismutase-chondroitin sulfate-catalase conjugate in endotoxic shock [Lechebnoe i preventivnoe deystvie bifermentnogo preparata superoksiddismutaza-khondroitinsul'fat-katalaza pri endotoksicheskom shoke]. *Tekhnologii zhivyykh sistem*, 11 (2), 35–44.
7. Baraune VG, Campos LCG, Miyakawa AA, Krieger JE (2011). ACE as a mechanosensor to shear stress influences the control of its own regulation via phosphorylation of cytoplasmic Ser<sup>12</sup>. *PLoS One*, 6 (8), e22803.
8. Bice JS, Keim Y, Stasch J-P, Baxter GF (2014). NO-independent stimulation or activation of soluble guanylyl cyclase during early reperfusion limits infarct size. *Cardiovascular Research*, (101), 220–228.
9. Brito R, Castillo G, Gonzales J, Valls N, Rodrigo R (2015). Oxidative stress in hypertension: mechanism and therapeutic opportunities. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 123 (6), 325–335.
10. Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R (2013). Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharmaceutical Research*, 30 (11), 2718–2728.
11. Ekelof S, Jensen SE, Rosenberg J, Gogenur I (2014). Reduced oxidative stress in STEMI patients treated by primary percutaneous coronary intervention and with antioxidant therapy: a systematic review. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 28 (12), 173–181.
12. Kimura S, Zhang G-X, Abel Y (2004). Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: oxidative stress of angiotensin-II – induced hypertension: mitogen activated protein kinase and blood pressure regulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (96), 406–410.
13. Maksimenko AV (2005). Experimental antioxidant biotherapy for protection of the vascular wall by modified forms of superoxide dismutase and catalase. *Current Pharmaceutical Design*, 11 (16), 2007–2016.
14. Maksimenko AV, Vavaev AV (2012). Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. Enzyme antioxidants: the next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress. *Heart International*, (7), 14–19. DOI: 10.4081/hi.2012.e3.
15. Münzel T, Gori T, Keaney JF Jr, Maack C, Daiber A. (2015). Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implementation. *European Heart Journal*, 36 (38), 2555–2564.

14. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, (71), 40-56.

15. Yamashita T, Sato T, Sakamoto K, Ishii H, Yamamoto J (2015). The free-radical scavenger edaravone accelerates thrombolysis with alteplase in experimental thrombosis model. *Thrombosis Research*, 135 (6), 1209-1213.

#### Сведения об авторах Information about the authors

**Максименко Александр Васильевич** – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела фундаментальных исследований Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России (121552, г. Москва, 3-я Черепковская ул. 15А; тел.: 8 (495) 414-60-25; e-mail: alexmak@cardio.ru)

**Maksimenko Aleksandr Vasilyevich** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Department of Basic Researches of Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex (121552, Moscow, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya str., 15A; tel.: +7 (495) 414-60-25; e-mail: alexmak@cardio.ru)

**Ваваева Анна Владимировна** – младший научный сотрудник отдела фундаментальных исследований Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России  
**Vavaeva Anna Vladimirovna** – Junior Research Officer of the Department of Basic Researches of Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex

**Абрамов Александр Александрович** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии сердца Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

**Abramov Aleksandr Aleksandrovich** – Junior Research Officer of the Laboratory of Experimental Heart Pathology of Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex

**Тимошин Александр Анатольевич** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

**Timoshin Aleksandr Anatolyevich** – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Physicochemical Analysis of Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex

**Звягинцева Марина Александровна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории стволовых клеток Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

**Zvyagintseva Marina Aleksandrovna** – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Stem Cells of Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex

**Лакомкин Владимир Леонидович** – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии сердца Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

**Lakomkin Vladimir Leonidovich** – Candidate of Medical Sciences, Leading Research Officer of the Laboratory of Experimental Heart Pathology of Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex