Максименко А. В.
«Институт экспериментальной кардиологии» ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, Москва

Молекулярные аспекты трансляционной кардиологии в исследованиях сосудистой стенки

DOI: 10.18087/cardio.2017.7.10008
Ключевые слова: эндотелиальный гликокаликс, гидратация сосудистой стенки, водно-электролитный обмен, антиоксидантные ферменты, модельные 3D-структуры белков.

Ссылка для цитирования: Максименко А. В. Молекулярные аспекты трансляционной кардиологии в исследованиях сосудистой стенки. Кардиология. 2017;57(7):66–79.

Резюме

Развитие современных методов биомедицинских исследований способствовало обособлению эндотелиального гликокаликса в исследовательский объект интенсивного изучения. Выявлено влияние степени гидратации сосудистой стенки на развитие патологических поражений, в том числе атеросклероза. По современным данным, развитие атеросклероза сопряжено с процессами водно-сульфатного и водно-натриевого обмена. Рассматривается концепция инициации атеросклеротических поражений сосудов дефицитом в организме содержащих серу соединений. Защитная функция гликокаликса против губительного действия окислительного стресса на сосудистую стенку связана с накоплением и удержанием им антиоксидантов. Проведен обзор протекторного действия разрабатываемых производных на основе антиоксидантных ферментов и применения расчетных методов для определения принципов функционирования гликокаликса и его модельного взаимодействия с системными и частными факторами. Подчеркивается лимитирующее влияние на развитие трансляционной медицины встречного движения знаний и специалистов от клиники к науке о живом и от науки о живом – к клинике.

Maksimenko A. V.
Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Molecular Aspects of Translational Cardiology in Vascular Wall Research

Keywords: endothelial glycocalyx; vascular wall hydration; water-electrolyte exchange; antioxidant enzymes; protein three-dimensional structure modeling.

For citation: Maksimenko A. V. Molecular Aspects of Translational Cardiology in Vascular Wall Research. Kardiologiia. 2017;57(7):66–79.

Summary

Clinical-biochemical research of vascular wall hydrated state, water-electrolyte balance has broadened substantially our notions concerning initiation mechanism of vessel damages, methods of their prevention and treatment. Consecutive study of endothelial glycocalyx functioning, computational research of its interaction with oxidative stress, regulation of its state has been aimed at development of novel means of the vascular system protection. Mutual efforts of clinicians and scientists should contribute to the productivity of results of translational cardiology.

Развитие трансляционной медицины (ТМ) способствует повышению эффективности терапии и появлению в клинике лекарственных средств нового поколения. Следует отметить, что в настоящее время уровень реальных клинических успехов ТМ заметно уступает их ожиданиям. Это относится и к кардиологии. Данные метаанализа исследований по изучению модели инфаркта миокарда (ИМ) на крупных животных выделяют в качестве лимитирующих факторов, затрудняющих успешный перенос полученных результатов в клиническую практику, обоснованный выбор клинически уместной/подходящей животной модели и рациональное построение проводимого изучения [1]. При этом своевременность оценки получаемых данных, пол животных и качество исследования достоверно связаны с наблюдаемыми последствиями и позволяют частично объяснять недостатки перехода к клиническому применению. Большая адекватность человеческому организму (анатомически, гемо- и фармакодинамически, пригодностью возможных режимов клинического лечения) моделей поражения крупных животных (по сравнению с мелкими животными) не отменяет имеющихся различий. Пациенты часто имеют сопутствующие осложнения/заболевания, такие как артериальная гипертония (АГ), сахарный диабет (СД), курение, избыточная масса тела, тогда как модели поражений крупных животных лишены их из-за трудностей воспроизведения, заметно увеличивающих стоимость и экспериментальную сложность работы. Разнообразие кардиологических

нарушений не оставляет упомянутое различие в качестве универсального. Так, устранение острых поражений (например, тромбозов) требует, в первую очередь, ликвидации закупорки – достоверно установленного сосудистого нарушения [2]. Эффективным средством для этой цели предстали активаторы плазминогена, обоснованно вошедшие в клиническую практику как тромболитические препараты [3]. В большинстве современных исследовательских работ доминирующее место занимают производные активаторов плазминогена, превосходящие по молекулярным размерам родительские формы. Используемые в клинической практике тромболитические препараты (метализе, ретаваза) имеют меньшие или сходные молекулярные размеры с родительскими молекулами. Такая разнонаправленность данных клинической практики и обширных исследований активаторов плазминогена подразумевает выбор продуктивного направления их биомедицинских разработок: в сторону уменьшения или увеличения молекулярных размеров [3]. Другим заметным аспектом рассмотрения становится значение для успеха ТМ выбора начальной стадии/формы острого поражения сердечно-сосудистой системы. Современная ориентация биофармацевтических исследований на разработку прорывных способов терапии [4], конкуренцию в наиболее обещающих открытия областях [5] способствует достижению эффективного клинического использования результатов ТМ [6]. Приближению к этому рубежу служат биомедицинские исследования познания человеческого организма по значимым составляющим его функционирования.

Движение знания, ведущее к постановке задачи исследовательской разработки, возможно при его направлении от медицины к науке о живом (рис. 1, А). В настоящее время это доминирующий путь научно-организационного формирования биомедицинских исследований. Он основывается на разных уровнях доказательств и программ разработки лекарств в клинической медицине и в исследованиях медицинской науки [6]. Вместе с тем результативным оказывается и инициирующий создание новых лекарственных средств переход от науки о живом к медицине (рис. 1, Б). Особую важность для продуктивности такого перехода имеют обоснованный выбор цели/направления исследования и разработка высокоэффективной технологии получения лекарственного производного. Успешность отмеченного сочетания была подтверждена выпуском тромболитических препаратов, опирающимся на выбор активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типа как терапевтического активного начала и своевременную подготовку и использование технологии рекомбинантных ДНК для производства указанных средств [2, 3]. Достижение гармоничного равновесия во встречном движении от клиники к науке о живом (см. рис. 1, А)

Рис. 1. Схема направлений развития биомедицинских исследований.

и от нее к терапии (см. рис. 1, Б), безусловно, способствует повышению эффективности ТМ (рис. 1, В).

Показан их переход от разных уровней доказательств и программ разработки лекарств в клинике (А) к последующим этапам научного доклинического изучения таких производных (Б) и в дальнейшем к разным фазам клинических испытаний и подготовки масштабированного выпуска нового лекарственного средства (В).

Первичный барьер сохранения целостности сосудистой стенки

Вполне распространенным и функционально значимым в системе кровообращения предстает клеточный гликокаликс [7, 8]. Актуальность и интерес к его исследованию существенно выросли с совершенствованием приемов лазерной сканирующей микроскопии (конфокального – CLSM и двухфотонного – TPLSM типа) тканевых образцов, позволяющих создавать реконструкцию визуализируемых объектов с последующей обработкой полученных данных. Методом CLSM был визуализирован эндотелиальный гликокаликс (ЭГЛК) толщиной 2–3 мкм на поверхности культивируемых эндотелиоцитов [9]. Визуализацию гликокаликса в крупных артериях (сонная артерия мыши с толщиной ЭГЛК 3,5–5,5 мкм) осуществили методом TPLSM при изучении тканей на глубине более 1 мм [10]. ЭГЛК предстал наружным слоем разнообразных

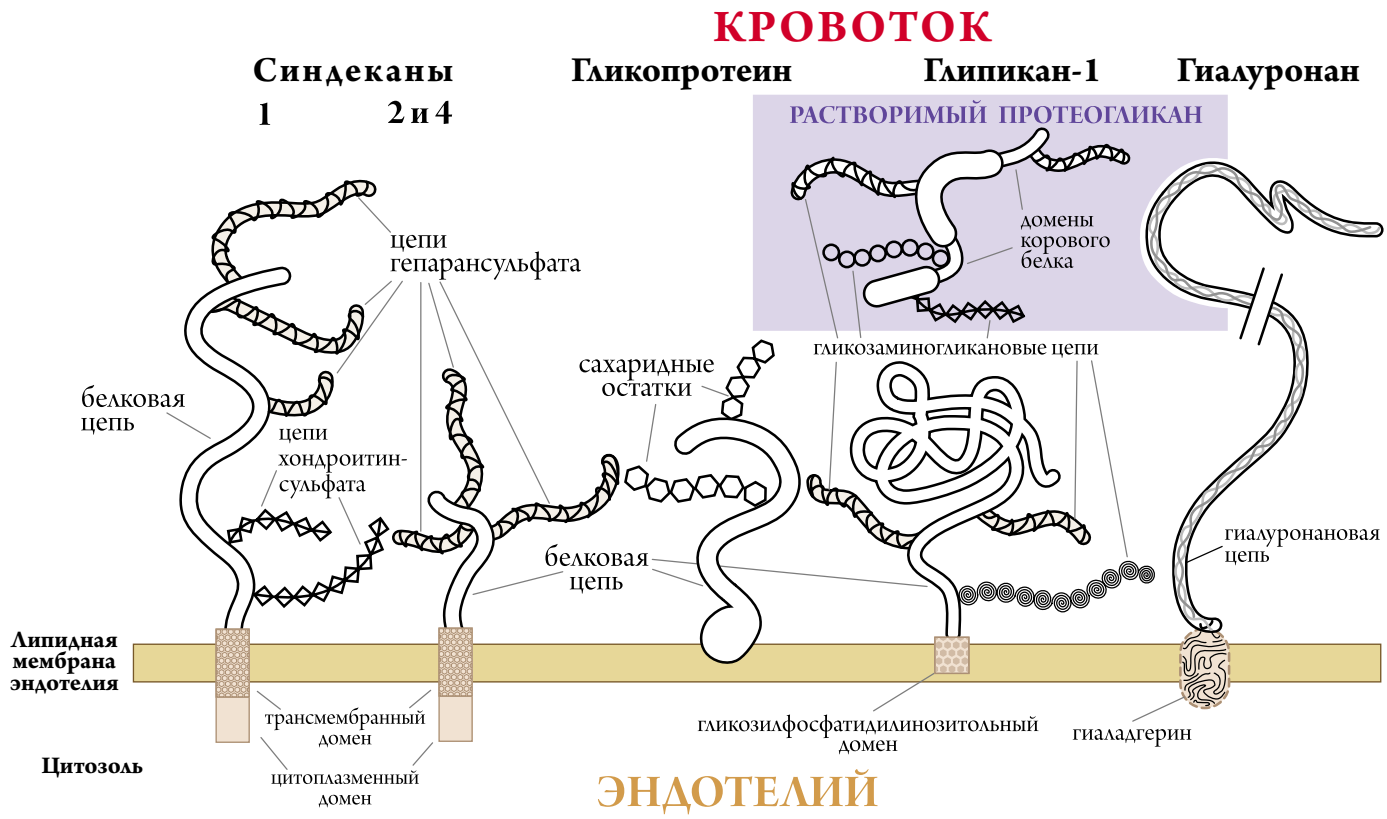

Рис. 2. Условное иллюстративное представление мембранных (синдеканы и глипикан-1) и растворимых (в обобщенном виде) протеогликанов эндотелиального гликокаликса с гиалуронаном и гликопротеинами на люминальной поверхности сосуда [8].

связанных с эндотелиальной мембраной макромолекул (в основном из белково-углеводных и углеводно-липидных комплексов), вместе с белками плазмы крови формирующих выстилку на эндотелии со специфической структурой и широким набором функций [7, 8, 11] (рис. 2).

Протеогликаны, входящие в группу синдеканов (с трансмембранным белковым доменом), подразделяются на 4 подтипа по составу гликозаминогликановых цепей. Группа глипиканов (связанная с мембраной через гликозилфосфатидилинозитольный домен) состоит из 6 подтипов по виду связи и числу гликозаминогликановых цепей. N-терминальная часть глипикана-1 (обращенная в просвет сосуда) содержит множество остатков цистеина, в результате чего принимает глобулярную форму, отличающую ее от вытянутых внеклеточных доменов синдеканов. Протеогликаны ЭГЛК классифицируются по разным признакам (видовому происхождению, составу цепей гликозаминогликанов, их количеству, типу корового белка и др.), объединяемые их функцией в организме – сопряжением вне- и внутриклеточных сигналов функционирования эндотелия.

Ведется апробация диагностических методик неинвазивной и воспроизводимой оценки состояния ЭГЛК у человека для соотнесения состояния с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ).

Такие оценки составляются с помощью методов ортогональной поляризационной спектроскопии (orthogonal polarization spectroscopy, OPS) [12] и методик темнопольной микроскопии (side-stream dark field imaging, SDF) [13]. Полученные результаты обнаружили обратную связь между толщиной ЭГЛК микроциркуляторной сети и наличием ФР ССЗ. Накопленные данные представляют ЭГЛК как потенциальную границу между состоянием здоровых и пораженных сосудов [14], что позволяет ему обоснованно превращаться в диагностический маркер и терапевтическую цель при ССЗ [15]. Таким образом, на люминальной поверхности сосудистой стенки имеется двойной защитный слой из эндотелиальных клеток и их гликокаликса. ЭГЛК оказывается первым защитным барьером поверхности сосуда от поражений.

Деструкция гликокаликса патологическими воздействиями

Рассмотрение ЭГЛК в качестве обособленного эндотелиального поверхностного слоя кровеносных сосудов представляет его в состоянии нормы как самообновляющуюся трехмерную сеть, находящуюся в динамическом равновесии с протекающей кровью [16]. При всем многообразии функций ЭГЛК (барьер сосудистой проницаемости и молекулярное сито, механотрансдуктор напряжения

ISSN 0022-9040. Кардиология. 2017;57(7).

сдвига кровотока, регулятор клеточной адгезии/лейкоциты, тромбоциты/и связывания ряда лигандов/хемокины, факторы роста/, депо вазоактивных соединений и ингибиторов факторов коагуляции и др.) сохранение/поддержание нормального уровня их реализации актуально для осуществления регуляторной роли ЭГЛК в отношении плазменного гомеостаза и гомеостаза сосудистой стенки [15–17].

При поражении сосудов под действием патологических факторов одной из первых происходит деструкция ЭГЛК. Она оказывается существенной начальной стадией в патофизиологии атеросклероза микроангиопатических осложнений СД и хронических заболеваний вен [18]. Воздействие ишемии/реперфузии, инфекционного поражения, развитие СД, почечной недостаточности ведет к деструкции ЭГЛК [19–21]. Уменьшение его объема при гипергликемии увеличивает уязвимость сосудов и совпадает с появлением дисфункции эндотелия – ДЭ (повышение плазменного уровня гиалуронана) и активацией коагуляции in vivo (увеличение содержания в крови фрагмента протромбина 1+2 и D-димера фибрина) [22]. Многообразные патологические воздействия (гиперхолестеринемия, воспаление, гипергликемия, избыток солей, изменение напряжения сдвига кровотока, нефротический синдром и др.) разрушают ЭГЛК [23–25]. Предполагается, что деструкция ЭГЛК (определяемая изменением его компонентного состава или снижением его толщины) играет важную роль в ДЭ [23, 26] и наблюдается у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) [27]. Разнообразие патологических факторов, разрушающих ЭГЛК и ведущих к развитию разных нозологий, вероятно, подразумевает наличие общей стадии поражения системы циркуляции, приводящей в дальнейшем к формированию весьма разных патологий.

Гидратированное и дегидратированное состояние сосудистой стенки

В состоянии нормы внеклеточная (экстрацеллюлярный матрикс, интерстиций) и околоклеточная (гликокаликс) гелевая компонента живых тканей поддерживается в относительно дегидратированных условиях [28]. Такое положение способствует надлежащему уровню функционирования кровотока и сосудистой проницаемости. Гидратационный объем гелевого матрикса регулируется балансом сил, включающим эластичность разных полимерных компонентов, их химическое сродство, фиксированный заряд, осмотические взаимодействия ионизированных растворенных веществ, и зависит от гликозаминогликанов (ГАГ) [29]. Последнее обусловлено заметной связью сил дегидратации с механическими и структурными факторами, отвечающими за количество и пространственное распределение ГАГ в интактных тканях.

Макромолекулярные взаимодействия, которые контролируют и определяют развитие атеросклероза, направлены против сил дегидратации, превалирующих в норме

Рис. 3. Иллюстрация деструкции эндотелиального гликокаликса [16]: она приводит к развитию атеросклероза, СД, сепсиса, поражения от ишемии/реперфузии, опухолевого ангиогенеза, метастазирования раковой опухоли, острого поражения легочной ткани.

in vivo. Действительно, сдвиг равновесия дегидратация/гидратация ЭГЛК в сторону гидратации может осуществляться в результате его разрушения патологическими воздействиями (рис. 3) [16, 30, 31]. Отмеченное выше противодействие влияет на объем гидратации, вызывая изменения в структуре и распределении ГАГ [28]. В патологических условиях (воспаление, тромбоз, инфекционное поражение и др.) происходит гидратация (проявляющаяся, в частности, в форме отека) тканей, что затрудняет поступление нутриентов и лекарственных средств. Сохраняющий целостность ЭГЛК защищает ткани от отека [30]. Отмеченное при атеросклерозе диффузионное утолщение и дезорганизация фибриллярных элементов в интиме сосудов указывают на нарушение локального водного гомеостаза [28].

Приведенные данные показывают, что дегидратированное и гидратированное состояния ЭГЛК предстают важным признаком нормы и развивающегося поражения сосудистой стенки. 60% массы организма взрослого человека в состоянии нормы сердечно-сосудистой и дыхательной систем составляет вода [32]: ⅔ этого количества локализуется внутриклеточно, а ⅓ – внеклеточно. В интерстициальном пространстве размещается 80% внеклеточного водного ресурса организма, а 20% приходится на часть плазменного объема крови.

Водно-сульфатный обмен

Конкретным фактором, влияющим на баланс воды в ЭГЛК, оказалась степень сульфатирования его ГАГ. Ее изменение меняло количество растворителя, пригодного к гидратации [28, 33]. Показано, что с развитием атероскле-

ротического поражения снижалась степень сульфатирования хондроитинсульфата (ХИС). В результате усиливалась гидратация ЭГЛК (в норме – дегидратационное состояние) и снижалась антикоагулянтная активность этого ГАГ (определенная по уменьшению активации антитромбина ХИС) [27]. Наличие водно-сульфатного обмена упоминалось еще при изучении влияния гиалуронана на гликокаликс хондроцитов цыпленка [34]. Продемонстрировано, что встраивание $^{35}SO_4$ в ГАГ гликокаликса медленно (через 12 ч) подавлялось тетрасахаридами гиалуронана и его производными более высокой молекулярной массы (50 мкг/мл). Суммарные данные указывают, что встраивание сульфатов в пораженных сосудистых участках с атеросклеротическими бляшками связано с накоплением атеромой сульфатированных ГАГ для их перераспределения. По-видимому, это можно рассматривать как осуществление опосредованной подготовки расширения площади сосудистой поверхности (с пониженной степенью сульфатирования), пригодной для увеличения потенциального поражения [35]. Сульфатированные ГАГ отличает их способность поддерживать в кровеносных сосудах зоны структурированной воды, необходимые для нормального функционирования системы кровообращения (состояние эндотелия и продвижение эритроцитов через капилляры). Подчеркивая значение дефицита содержащих серу соединений в организме, предполагается, что такой дефицит вызывает снижение уровня холестеролсульфата и степени сульфатирования ГАГ [35]. Отмеченная потеря сульфатов способствует нарушениям структурированной воды, ведущим к накоплению атеромой холестерола, так как его транспорт через водную среду зависит от сульфатирования (т. е. ухудшение транспорта холестерола обусловлено низкой биодоступностью сульфатов в сосудистой системе). Предлагается новая гипотеза, согласно которой сниженная поддержка присутствия холестеролсульфата в организме (вместе с уменьшением степени сульфатирования ГАГ) оказывается ключевым нарушением, ведущим к развитию атеросклероза [35].

Водно-натриевый обмен

Наличие отрицательного заряда на сосудистой стенке (создаваемого в основном ЭГЛК) и на движущихся с кровью объектах (например, эритроциты) способствует беспрепятственному движению кровотока по сосудам. Удаление отрицательного поверхностного заряда (в результате ферментной обработки) повышает адгезионное взаимодействие эритроцитов с эндотелиальными клетками [36]. В определенных концентрациях подобный эффект вызывают катионы натрия. В интервале высоких физиологических концентраций (выше 140 мМ) Na^+ насыщает отрицательные поверхностные заряды, увеличивая адгезию. При концентрации Na^+ ниже 140 мМ сохраняется достаточное количество вакантных отрицательных зарядов, и адгезия эритроцитов к эндотелиальной поверхности невелика. Так, Na^+ обеспечивает адгезию эндотелию к эритроцитам [36]. Сохранение плазменного Na^+ в ЭГЛК (с частичной нейтрализацией отрицательного поверхностного заряда) позволяет подразделить ЭГЛК на «хороший», имеющий высокую способность накопления катионов натрия с поддержанием достаточного поверхностного отрицательного заряда при нормальном уровне плазменного Na^+, и «плохой» ЭГЛК, в случае, если потеря отрицательного заряда поверхности способствует неблагоприятным взаимодействиям между эндотелием и эритроцитами [37]. Отмечалось, что более глубокое проникновение эритроцитов в ЭГЛК ассоциируется с ухудшенной микрососудистой перфузией [38]. Концепция «хорошего» и «плохого» гликокаликса послужила разработке «солевого теста крови», при котором количественное определение эритроцитарного натрия качественно позволяет опосредованно оценить состояние внутренней сосудистой стенки [37]. Повышенной солевой чувствительностью, по данным «солевого теста крови», более часто отличались пациенты, страдающие АГ (несмотря на антигипертензивное лечение). Следует отметить, что при среднем соотношении селективности Na^+/K^+ в эритроцитарном гликокаликсе, равном 6,1±0,39, их связывание на поверхности эритроцита соответствует 180:1 [39]. Таким образом, низкая концентрация катионов натрия поддерживает гладкое скольжение эритроцитов по кровеносным сосудам, а сохранение ЭГЛК оказывается крайне важным для реализации сбалансированной функции сосудистой системы [37, 39].

Приведенные данные водно-сульфатного и водно-натриевого обмена подчеркивают значение водно-электролитного баланса для поддержания функции ЭГЛК и состояния сосудистой стенки. Исследование отмеченных взаимодействий перспективно установлением новых кардиологически значимых регуляторных связей системы кровообращения.

Гликокаликс и активные формы кислорода

Общее распространение ЭГЛК по разным сосудистым поверхностям придает ему системную значимость. Наглядно такие особенности сосудистой повсеместности гликокаликса проявляются, в частности, в осуществлении метаболизма кислорода и его форм в системе кровообращения. В умеренных концентрациях активные формы кислорода (АФК) могут действовать в качестве медиаторов передачи клеточного сигнала в живом организме. При повышенных концентрациях АФК оказывают повреждающее действие [40]. ДЭ как ключевой начальный этап развития атеросклероза связана с повышенной продукцией АФК или окислительным стрессом (ОС). Он выступает основным фактором патогенеза ДЭ. Унифицированный механизм поражающего действия ОС

ISSN 0022-9040. Кардиология. 2017;57(7).

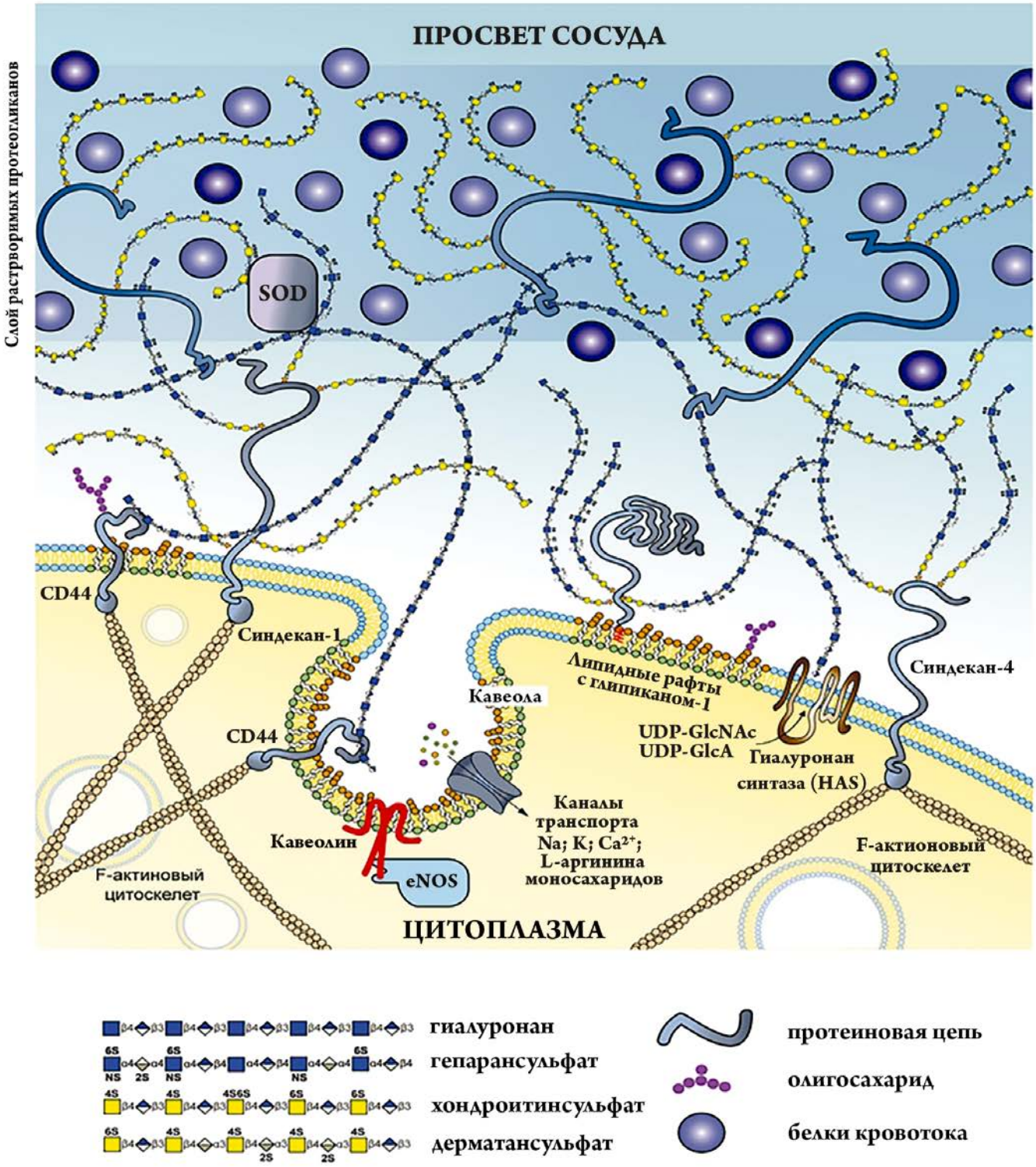

Рис. 4. Гипотетическая схема основных компонентов состава гликокаликса на поверхности эндотелия [8].

придает ему доминанту развития многих повреждений сердечно-сосудистой системы [41, 42]. Избыточное генерирование АФК ведет к деструкции ЭГЛК [43]. Для предупреждения и снижения такого поражения ЭГЛК способен аккумулировать антиоксиданты, в частности, внеклеточную супероксиддисмутазу (СОД) (рис. 4). Указана локализация внеклеточной СОД, обладающей сродством к гепарансульфатным структурам гликокаликса. Его защитная функция против поражающего действия ОС реализуется, в частности, посредством аккумуляции антиоксидантов, в том числе и внеклеточной СОД, превращающей цитотоксический супероксид-радикал в пероксид водорода. СОД обладает как высоким сродством к гепарансульфатам ЭГЛК, благодаря наличию в его молекулярном составе специфического положительно заряженного домена связывания гепариноподобных структур, так и высоким уровнем экспрессии (70% от общего содержания СОД в сосудистых тканях) [11]. Интересное сообще-

ние касается роли ЭГЛК в продуцировании NO и АФК [44]. На феморальных артериях свиней ex vivo обнаружено, что после удаления гиалуронана (обработкой гиалуронидазы) снижались как содержание нитритов, так и вазодилатация. Деградация гепарансульфатпротеогликанов и сиаловой кислоты (после воздействия гепариназой III и нейраминидазой) уменьшала биодоступность NO посредством повышения продуцирования супероксид-радикала. Такие данные представляли гиалуронан вовлеченным в индуцированное напряжением сдвига кровотока продуцирование NO, а гепарансульфат и сиаловая кислота играли роль в образовании АФК в сосудистой стенке в ответ на воздействие напряжения сдвига. Развитие большинства сердечно-сосудистых нарушений сопровождалось ОС. Такое положение обоснованно ставит задачу блокирования или снижения его губительного действия. Этой цели служат эндо- и экзогенные антиоксиданты.

Формирование антиоксидантной терапии

Клинические исследования антиоксидантов касаются как проверки гипотезы, что низкий уровень в организме пациентов глутатионпероксидазы и СОД ведет к повышенному риску развития тяжелых ССЗ [45], изменение экспрессии и/или активности антиоксидантных ферментов сопряжено с развитием ОС, выступающего важным фактором патогенеза возрастных (макулярная дегенерация) и дегенеративных заболеваний [46], так и определением эффективности антиоксидантного лечения с выявлением неблагоприятного влияния ОС на конкретные клинические показатели сердечно-сосудистой терапии [41, 42].

Формирование и развитие стратегий лечения антиоксидантами предполагают исследование и разработку их новых форм [47, 48]. Такие работы ведутся и в настоящее время. Исследуется защитное действие антиоксидантных соединений (аскорбиновая кислота, тролокс, мелатонин, полифенолы) [49], рекомбинантной Mn-СОД человека [50] при поражениях печени, действие химически модифицированной полимерами СОД на окисление липидов и антиоксидантный статус диабетических крыс [51], изменение активности СОД и каталазы (КАТ) из-за неверного сворачивания их молекул в условиях ОС in vivo, индуцированного кадмием [52]. Прослеживается неослабевающая актуальность биомедицинских разработок антиоксидантных ферментных средств.

Используя наноноситель (защитный антиоксидантный носитель для эндотелиального нацеливания), преципитируют с ним СОД и КАТ (до 30% общего количества используемого фермента) и связывают с антителами к молекулам адгезии эндотелия (для обеспечения нацеливания) [53]. На модели индуцированного эндотоксином поражения легких у мышей производное КАТ защищает эндотелий от гибели при воздействии пероксидом водорода и снижает отек легких и инфильтрацию лейкоцитов. Производное СОД смягчает провоспалительную активацию эндотелия, индуцированную цитокинами, и воспаление легких, вызванное эндотоксином. В результате предлагается модулярный подход для нацеливания терапевтических ферментов на сосудистую стенку [53]. Среди трех концентрационных интервалов АФК и азота (физиологического, повышенного и токсического) эффективным воздействием на последний обещает проявиться центр-специфическая, мультифункциональная система доставки нанолекарств [54], построение трехмерных супрамолекулярных ансамблей с антиоксидантными соединениями или ферментами [55], нанотерапевтики двойной направленности (с антиоксидантным ядром для блокирования атерогенного ОС и амфифильной полисахаридной оболочкой, нацеленной на скавенджер-рецептор для ослабления атеровоспалительного цикла) [56]. Среди полученных достижений и обещающих перспективу результатов важно отметить, что полнота блокирования всех АФК требует кооперативности действия антиоксидантов [57], в том числе синергических сочетаний антиоксидантных ферментов, как полученный нами биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза (СОД-ХИС-КАТ) [58].

Биферментный конъюгат антиоксидантных биокатализаторов

Благодаря ковалентному соединению СОД с КАТ посредством ХИС (в молекулярных рамках единого биферментного конъюгата СОД-ХИС-КАТ), полученному производному удается обеспечить одновременное присутствие в очаге поражения указанных антиоксидантных биокатализаторов. В результате конъюгат СОД-ХИС-КАТ по эффективности своего антитромботического действия in vivo достоверно превосходит эффекты разных сочетаний/смесей составляющих его ферментов в разных (нативных и модифицированных) формах [48, 58] и проявляет терапевтическую активность в невысоких дозах (25–50 ед. активности СОД и 55–110 ед. активности КАТ на крысу) на 1–2 порядка ниже, чем доза нативных или модифицированных ферментов [59]. На начальных стадиях атерогенеза отмечалось увеличение содержания ХИС на сосудистой поверхности зон атеросклеротического поражения [60]. Раннее утолщение интимы сосудистой стенки характеризуется заметным присутствием версикана (протеогликана с цепями ХИС и дерматансульфата) [61]. В стенках сосудов человека, склонных к атеросклеротическому поражению, накапливается версикан, им насыщаются зоны неоинтимального образования в пораженных сосудах [62]. Установленная особенность ХИС [60–62] превращает его в продуктивный агент, сшивающий антиоксидантные ферменты [47] и способствующий нацеливанию их конъюгата в зоны

ISSN 0022-9040. Кардиология. 2017;57(7).

ЭГЛК с поражениями сосудов. Видимо, благодаря этому конъюгат СОД-ХИС-КАТ оказывает in vivo глубокое антиоксидантное действие в малых дозах [47, 48]. Следует отметить, что при эндотоксическом шоке применение конъюгата СОД-ХИС-КАТ достоверно повышает жизнеспособность организма животных не только при превентивном, но и лечебном (после начала развития поражения) введении [58]. Такие результаты интересны сравнением с модельными терапевтическими эффектами модулярных подходов [53] и обоснованной постановкой задач выяснения механизма действия конъюгата СОД-ХИС-КАТ, определения возможностей NO-зависимого и NO-независимого путей проявления его терапевтического эффекта. Продемонстрированные эффекты экспериментальной терапии конъюгатом СОД-ХИС-КАТ способствуют укреплению исследовательского интереса к получению генетическими и биоинженерными технологиями трехфункционального фермента со способностью вхождения в клетки и с активностями СОД и КАТ [63], как и пероксидазы и СОД [64]. Расширяется круг разрабатываемых лекарственных производных на основе антиоксидантных ферментов.

Развитие антиоксидантной терапии выявляет и определяет ее перспективные агенты для дальнейшей разработки с целью успешного блокирования ОС. Его поражающее действие на сосудистую стенку предстает многосторонним противоборством весьма многокомпонентных системных факторов. Множество переменных, важных для оценки и регуляции отмеченного взаимодействия, обусловливает полезность применения расчетных методов для оптимизации решений поставленной медико-биологической проблемы.

Расчетные изучения с системными факторами и их регуляторами

Использование расчетных взаимодействий (расчетных моделей) для оценки и прогнозирования функционирования биологических систем (таких как, например, системы фибринолиза, коагуляции и др.) известно не одно десятилетие. Недостатком такого подхода служит сложность общего представления полученных данных и их отрыв от доступной экспериментальной оценки/верификации. Вовлечение в решение проблем ТМ новых системных факторов повысило значимость применения расчетных мето-

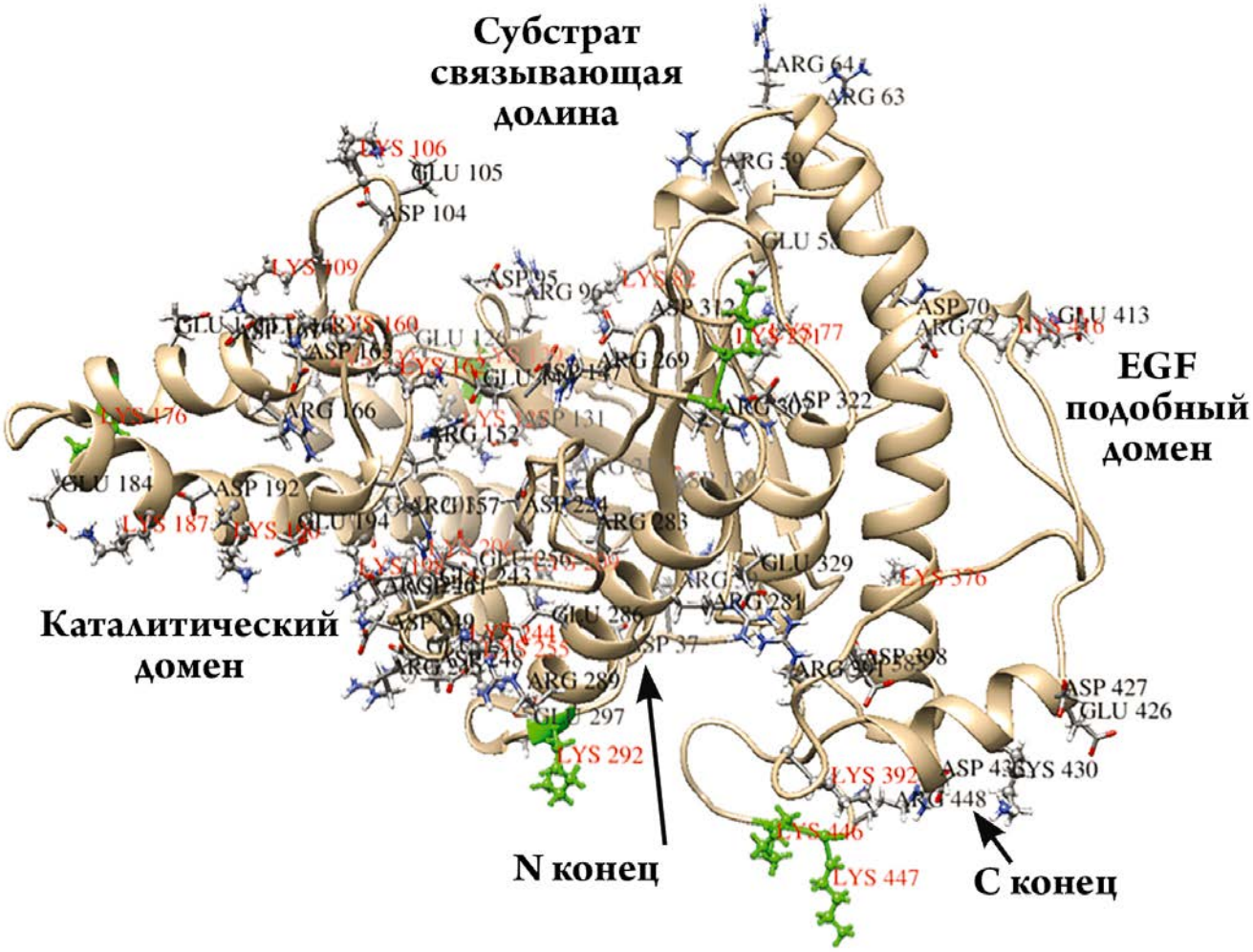

Рис. 5. Иллюстративное представление 3D-модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы [71].

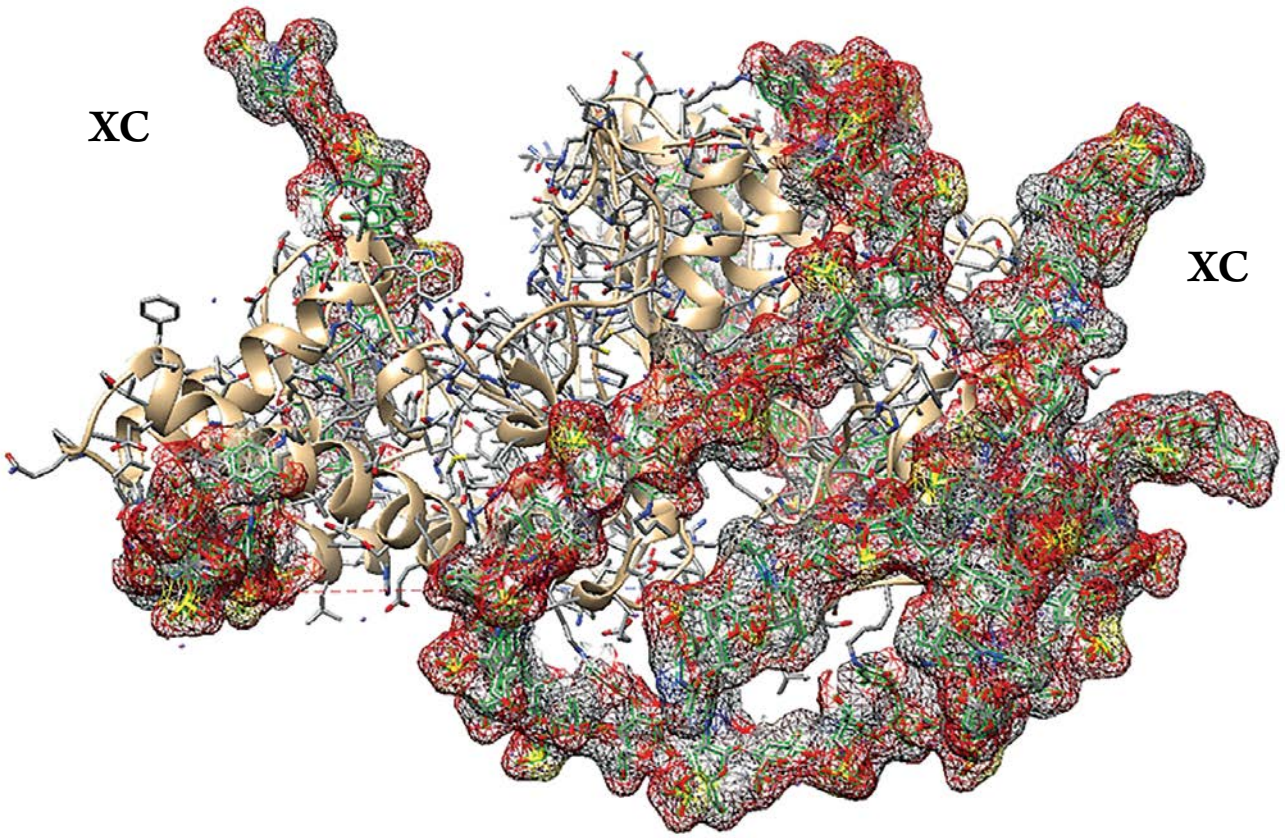

Рис. 6. Изображение 3D-модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы, ковалентно модифицированной двумя цепями ХИС (окрашенными в серый, красный, коричневый цвета) [71].

дов. В настоящее время они используются с ориентацией на экспериментальную проверку и касаются достаточно общих объектов анализируемых систем. Для установления вариаций в свойствах микроциркуляторного потока проведено расчетное изучение моделирования взаимодействия гликокаликса, эндотелия и эритроцита [65]. Вариации свойств потока определялись изменениями стенки сосуда, связанными с формой эндотелиальных клеток, эффектами слоя ЭГЛК и специфической природой крови. Кровь моделировалась как двухкомпонентная (плазма и распределенные в ней корпускулярные элементы) несжимаемая жидкость. ЭГЛК предстает в модельном виде как среда вариабельной и адаптивной пористости, проявляющейся в величине и преходящей скорости потока, и его напряжения сдвига. По данным изучения отмечается комбинированное и одновременное влияние на свойства потока волнистости/неровности эндотелиальной стенки, сжатия ЭГЛК, отталкивания и особой природы крови [65].

Для обоснованной оценки состояния биологических систем используют структурные построения влияющих на них компонентов, внешних агентов и проводят расчетными методами анализ регуляции функционирования таких реактантов. Изучение механизма специфичности взаимодействия гликансвязывающего белка с родственным гликаном (среди набора гликанов клеточного гликома) начато с использованием техники автоматизированного создания их 3D-структуры (трехмерной структуры, называя метод расчетным карбогидратным прививанием) [66]. Интеграция обширных данных гликанового скрининга с результатами моделирования и кристаллографии белков способствует построению предполагаемых структур со-комплексов, которые могут быть объективно оценены и повторно скорректированы для достижения высокого уровня согласованности с данными эксперимента. Такой подход позволяет различить активные детерминанты связывания среди множества потенциальных детерминант гликана. Применение метода к коллекции 10 комплексов белок – гликан (с ранее сообщенными для них кристаллографическими и другими данными) позволяет обеспечить прививанию структурную рационализацию со специфичностью связывания более 90% для 1 223 гликанов [66]. Для получения детализированных данных ГАГ-белковых взаимодействий использовали автоматизированный молекулярный докинг и технику отображения взаимодействия этих агентов [67]. Метод был применен для идентификации ГАГ, способных к связыванию кислого фактора роста фибробластов. Полученные данные подчеркивают ценность техники отображения взаимо-

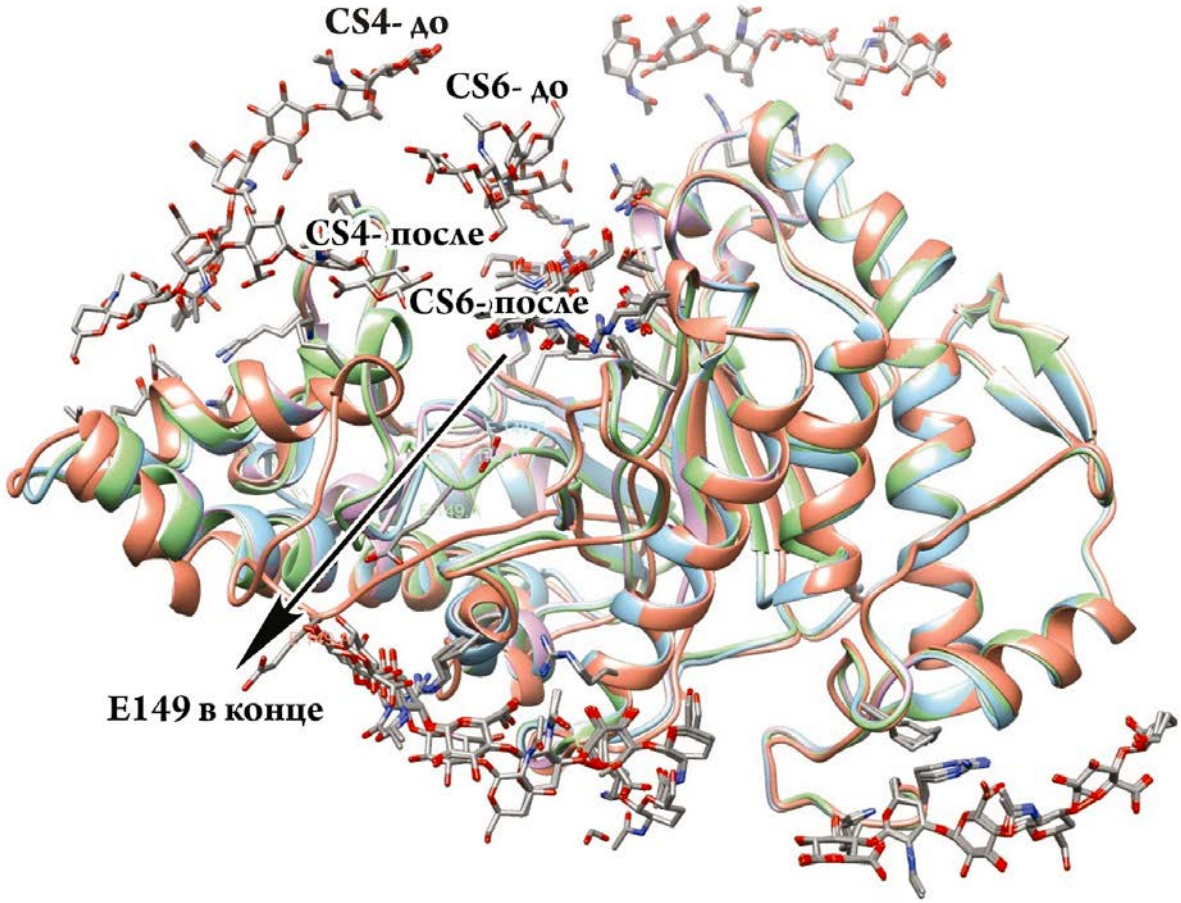

Рис. 7. Демонстрация необратимых конформационных изменений на 3D-модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы с обозначением расположения фрагментов ХИС (представленных как cs4 до/после и cs6 до/после) до и после конформационного перехода.

действия для определения специфических эпитопов ГАГ, связывающих белки, и для структуры лекарств на основе ГАГ. Технология скрининга комбинаторных виртуальных библиотек использована для преодоления сложностей рассмотрения феноменального множества структур ГАГ и выявления их последовательностей высокой специфичности связывания с белками [68]. Данные изучения подчеркивают критическую важность взаимодействия олигосахаридов гепарина и гепарансульфата, которые регулируют специфичность, а элементом минимальной специфичности оказывается дисахарид гепарина.

Антиоксидантные ферменты (КАТ, СОД, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) выступают агентами защиты против ОС. Методом гомологичного моделирования были построены 3D-структуры этих биокатализаторов и выполнен докинг с нонилфенолом и бисфенолом А [69]. Оказалось, что ферменты имеют связывающие нонилфенол и бисфенол А (индуцирующие ОС) центры. КАТ максимально ингибируется бисфенолом А, а СОД – нонилфенолом. Такие результаты определяют конкретные условия для эффективного применения СОД и КАТ. Ферментативным воздействием на состояние ЭГЛК удается устранять нарушения микроциркуляции при ишемии [70]. Действенным средством этого стали гликозидазы, в частности, гиалуронидаза. Однако недостаток структурной информации о таких биокатализаторах сдерживает изучение механизмов регуляции состояния ЭГЛК. Для преодоления этого барьера используется моделирование 3D-структуры бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ) [71]. Методом молекулярного гомологичного моделирования (используя в качестве прототипа установленную пространственную структуру гиалуронидазы человека [72]) была построена in silico 3D-модель БТГ (рис. 5). Наложение (суперпозиция) модельной структуры БТГ со структурой гиалуронидазы человека и гиалуронидазы из яда пчел обнаружило их определенные различия [71]. В первую очередь они связаны с наличием в молекуле гиалуронидазы человека С-концевого домена (Ser-353 – Trp-435), гомологичного эпидермальному фактору роста (EGF) [72], его наличием в построенной нами 3D-модели БТГ (см. рис. 5) и отсутствием в составе пространственной структуры гиалуронидазы из яда пчел. Домен EGF имеет 3 дисульфидные связи, достаточно стабилен и может регулировать связывание с другими белками и модулировать активность полномерной формы фермен-

та [71, 72]. При моделировании ковалентного связывания с лизиновыми остатками фермента активированных бензохиноном звеньев ХИС была построена 3D-структура БТГ, модифицированной ХС (рис. 6). Варьированием как степени модификации биокатализатора, так и размера ковалентно присоединенных к нему цепей ХИС было продемонстрировано значение глубоких степеней модификации БТГ для получения активных и стабильных ферментных производных, подтвержденная экспериментально. Эффективный размер ХИС оболочки для продуктивной модификации гиалуронидазы достигается при увеличении молекулярной массы ферментного производного ориентировочно до 180 kDa и может быть достигнут с использованием ХИС разной молекулярной массы (как 30–50, так и 120–140 kDa) [71].

Показано расположение аминокислотных остатков лизина, аспарагина, глутаминовой и аспарагиновой кислот в структурной модели фермента. Шесть остатков лизина первого уровня доступа (внешние свободные остатки) окрашены зеленым цветом.

Полимерные цепи ХИС необходимы для глубокой модификации фермента с присоединением по его 19 поверхностным остаткам лизина (по позициям 77, 106, 122, 129, 176, 187, 190, 198, 206, 244, 255, 271, 292, 376, 392, 416, 430, 446, 447). Ферментная структура, показанная в ленточном виде и в форме отрезков, экранируется ковалентно присоединенными цепями ХИС (30 kDa).

Ковалентное присоединение ХИС к лизиновым остаткам на поверхности молекулы БТГ выявило разные уровни их доступности. Их можно подразделить на внешние свободные, полусвободные остатки, модификация которых влияет на каталитический домен гиалуронидазы, и остатки, маскированные внутри ферментной глобулы [71]. Отметим, что эпификан посредством его кластеризированного ХС связывается с лизиновыми остатками коллагена I, III, VII, VIII и X типа с высоким сродством, в то время как связывание с коллагеном II, IV, V, VI и IX типа демонстрирует низкое сродство [73]. Химическая модификация лизиновых остатков в коллагене снижает связывание с кластеризированным ХИС, определяя сродство с эпификаном. Исследование начальной фазы докинга 3D-модели БТГ с тримером ХИС или тетрамером гепарина обнаружило несколько центров связывания фрагментов ГАГ на поверхности молекулы фермента (рис. 7). Показаны при этом как обратимые, так и необратимые конформационные изменения 3D-структуры БТГ в зависимости от расположения других отрицательно заряженных лигандов ГАГ на глобуле белка. Ключевые для каталитической активности фермента аминокислотные остатки Glu-149 (E 149) и Asp-147 (D 147) перемещаются в случае необратимых конформационных изменений из области активного центра нативного биокатализатора на периферию гиалуронидазной молекулы, вызывая инактивацию фермента (см. рис. 7). Полученные данные указывают на наличие возможных пороговых взаимодействий, ставя задачу их определения для направленной регуляции функционирования гиалуронидазы на сосудистой стенке.

Перемещение позиции Glu-149 от начальной к финальной стадии перехода показано стрелкой. Из области активного центра бычьей тестикулярной гиалуронидазы Glu-149 (E 149) и Asp-147 (D 147) перемещаются на периферию молекулы биокатализатора.

Представленные данные показывают, как с применением расчетных методов изменяются наши знания о функционировании многокомпонентных биологических систем и последовательно выясняются подходы к регуляции их состояния.

Заключение

Современное превращение эндотелиального гликокаликса в значимый объект систематического изучения выявило лимитирующие особенности его функционирования. Исследование регуляции степени гидратации сосудистой стенки открывает пути к пониманию инициации сосудистых нарушений, связанных с водно-электролитным балансом. Развитие этого исследовательского направления во многом определяется клиническими данными. Управление взаимодействием факторов таких обширных систем, как сосудистый гликокаликс и окислительный стресс, обещает продуктивные подходы развития антиоксидантной терапии. Усилиями исследователей все более весомой становится роль антиоксидантных ферментов для коррекции неблагоприятных нарушений метаболизма. Для развития приемов профилактической и терапевтической регуляции функционирования такой многокомпонентной системы, как сосудистая, целесообразным оказалось применение расчетных методов. Они нацелены на выяснение принципов функционирования в системе кровообращения эндотелиального гликокаликса и определения действенных приемов и средств их использования. Такое направление исследований развивается во многом благодаря научным изысканиям. Рассмотренные молекулярно-клеточные аспекты функционирования сосудистой системы способствуют развитию трансляционной кардиологии. Результативность этого развития определяется достижением встречного движения получаемых знаний и усилий специалистов от клиники к науке о живом и от науки о живом – к клинике. Такое встречное движение – определяющий фактор продуктивности трансляционной медицины.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 15-04-03584) и Министерства здравоохранения Российской Федерации..

Сведения об авторах:

«Институт экспериментальной кардиологии» ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, Москва

Максименко А. В. – д.биол.н., проф.

E-mail: alex.v.maks@mail.ru

Information about the author:

Institute of Experimental Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Alexandr V. Maksimenko – PhD, DrSci, professor.

E-mail: alex.v.maks@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. van Hout G. P. J., Jansen of Lorkeers S. J. J., Wever K. E. et al. Translational failure of anti-inflammatory compounds for myocardial infarction: a meta-analysis of large animal models. Cardiovasc Res 2016;109:240–248.
2. Van de Werf F. The history of coronary reperfusion. Eur Heart J 2014;35:2510–2315.
3. Maksimenko A. V. Cardiological biopharmaceuticals in the conception of drug targeting delivery: practical results and research perspectives. Acta Naturae 2012;4 (3):72–81. Russian (Максименко А. В. Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы. Acta Naturae 2012;4 (3):76–86).
4. Scott C. Speeding development and lowering cost while enhancing quality: a BPI theater roundtable at the 2015 BIO Convention. Bioprocess Int 2015;13 (4):23–25, 53.
5. Hoefer I. E., Steffens S., Ala-Korpela M. et al. On behalf of the ESC Working Group Atherosclerosis and Vascular Biology. Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. Eur Heart J 2015;36:2635–2642.
6. Lüscher T. F. The bumpy road to evidence: why many research findings are lost in translation. Eur Heart J 2013;34:3329–3335.
7. Reitsma S., Slaaf D. W., Vink H. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Pflugers Arch 2007;454 (3):345–359.
8. Maksimenko A. V., Turashev A. D. Endothelial glycocalyx of blood circulation system. I. Detection, components, and structure organization. Russ J Bioorg Khim 2014;40 (2):119–128. Russian (Максименко А. В., Турашев А. Д. Эндотелиальный гликокаликс системы кровообращения. I. Обнаружение, компоненты, структурная организация. Биоорган химия 2014;40 (2):131–141).
9. Barker A. L., Konopatskaya O., Neal C. R. et al. Observation and characterization of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. Phys Chem Chem Phys 2004;6:1006–1011.
10. Megens R. T. A., Reitsma S., Schiffers P. H. M. et al. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. J Vasc Res 2007;44:87–98.
11. Maksimenko A. V., Turashev A. D. Endothelial glycocalyx of blood circulation system. II. Biological functions, state under normal and pathological conditions, and bioengineering applications. Russ J Bioorg Khim 2014;4 (3):237–251. Russian (Максименко А. В., Турашев А. Д. Эндотелиальный гликокаликс системы кровообращения. II. Биологические функции, состояние в норме и патологии, биоинженерное использование. Биоорган химия 2014;40 (3):259–274).
12. Nieuwdorp M., Menwese M. C., Mooij H. L. et al. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. J Appl Physiol 2008;104:845–852.
13. den Uil C. A., Klijn E., Lagrand W. K. et al. The microcirculation in health and critical disease. Prog Cardiovasc Dis 2008;51:161–170.
14. Nieuwdorp M., Menwese M. C., Vink H. et al. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. Curr Opin Lipidol 2005;16 (5):507–511.
15. Broekhuizen L. N., Mooij H. L., Kastelein J. J. et al. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol 2009;20 (1):57–62.
16. Maksimenko A. V. Endothelial glycocalyx as orchestrator of vascular homeostasis. New research problems and prospects for vascular wall protection. Russ Chem Bull 2015;65:2036–2042. Russian (Максименко А. В. Эндотелиальный гликокаликс – настройщик сосудистого гомеостаза. Новые исследовательские задачи и перспективы защиты стенки кровеносных сосудов. Изв АН. Сер Хим 2015;9:2036–2042).
17. Becker B. F., Jacob M., Leipert S. et al. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. Br J Clin Pharmacol 2015;80 (3):389–402.
18. Minari F. A. C. Medical significance of endothelial glycocalyx. Part 2. Its role in vascular diseases and in diabetic complications. Arch Cardiol Mex 2014;84 (2):110–116.
19. Salmon A. H., Satchell S. C. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. J Pathol 2014;226 (4):562–574.
20. Vlahu C. A., Lemkes B. A., Struijk D. G. et al. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. J Am Soc Nephrol 2012;23 (11):1900–1908.
21. Singh A., Friden V., Dasgupta I. et al. High glucose causes dysfunction of the human gromerular endothelial glycocalyx. Am J Physiol Renal Physiol 2011;300 (1):F40 – F48.
22. Nieuwdorp M., van Haeften T. W., Gouverneur M. C. et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. Diabetes 2006;55 (2):480–486.
23. Salmito F. T., de Oliveira Neves F. M., Meneses G. C. et al. Glycocalyx injury in adults with nephritic syndrome: association with endothelial function. Clin Chim Acta 2015;447:55–58.
24. Shakya S., Wang Y., Mack J. A., Maytin E. V. Hyperglycemia-induced changes in hyaluronan contribute to impaired skin wound healing in diabetes: review and perspective. Int J Cell Biol 2015;2015:701–738.
25. Vlahu C. A., Krediet R. T. Can plasma hyaluronan and hyaluronidase be used as markers of the endothelial glycocalyx state in patients with kidney disease? Adv Perit Dial 2015;31:3–6.
26. Miranda S., Armengol G., Le Besnerais M. et al. New insight into systemic sclerosis related microcirculatory dysfunction by assessment of sublingual microcirculation and vascular glycocalyx layer. Results from a preliminary study. Microvasc Res 2005;99:72–77.
27. Miranda C. H., de Carvalho Borgers M., Schmidt A. et al. Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome. Atherosclerosis 2016;247:184–188.
28. McGee M., Wagner W. D. Chondroitin sulfate anticoagulant activity is linked to water transfer. Relevance to proteoglycans structure in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1921–1927.
29. Maksimenko A. V. Effects of glycosaminoglycans in vascular events. Pharm Chem J 2008;42 (10):3–13. Russian (Максименко А. В. Эффекты гликозаминогликанов в сосудистых событиях. Химфарм журн 2008;42 (10):3–13).

30. van den Berg B. M., Vink H., Spaan J. A. E. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. Circ Res 2003;92 (6):592–594.
31. Dongaonkar R. M., Stewart R. H., Geissler H. J., Laine G. A. Myocardial microvascular permeability, interstitial oedema, and compromised cardiac function. Cardiovasc Res 2010;87:331–339.
32. Becker B. F., Chappell D., Jacob D. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. Basic Res Cardiol 2010;105 (6):687–701.
33. Di Cera E. Atherosclerosis. Testing the water. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1713–1714.
34. Solursh M., Hardingham T. E., Hascall V. C., Kimura J. H. Separate effects of exogenous hyaluronic acid on proteoglycans synthesis and deposition in pericellular matrix by cultured chick embryo limb chondrocytes. Dev Biol 1980;75 (1):121–129.
35. Seneff S., Davidson R. M., Lauritzen A. et al. A novel hypothesis for atherosclerosis as a cholesterol sulfate deficiency syndrome. Theor Biol Med Model 2015;12:9. doi: 10.1186/s12976-015-0006-1.
36. Oberleithner H., Wälte M., Kusche-Vihrog K. Sodium renders endothelial cells sticky for red blood cells. Front Physiol 2015;6:188. doi: 10.3389/fphys.2015.00188.
37. Oberleithner H., Wilhelmi M. Vascular glycocalyx sodium store – determinant of cell sensitivity? Blood Purif 2015;39 (1–3):7–10.
38. Lee D. H., Dane M. J., van den Berg B. M. et al. NEO study group. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. PLoS One 2014;9 (5):e96477.
39. Oberleithner H. Sodium selective erythrocyte glycocalyx and salt sensitivity in man. Pflugers Arch 2015;467 (6):1319–1325.
40. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002;82 (1):47–95.
41. Münzel T., Gori T., Bruno R. M., Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? Eur Heart J 2010;31:2741–2749.
42. Ekelof S., Jensen S. E., Rosenberg J., Gögenur I. Reduced oxidative stress in STEMI patients treated by primary percutaneous coronary intervention and with antioxidant therapy: a systematic review. Cardiovasc Drugs Ther 2014;28 (2):173–181.
43. Vink H., Constantinescu A. A., Spaan J. A. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implication for platelet-endothelial cell adhesion. Circulation 2000;101 (13):1500–1502.
44. Kumagai R., Lu X., Kassab G. S. Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med 2009;47 (5):600–607.
45. Holley A., Miller J., Harding S., Larsen P. Prognostic significance of antioxidant enzymes in acute coronary syndromes. Cardiovasc Res 2014;103 (1):S142.
46. Tokarz P., Kaamiranta K., Blasiak J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). Biogerontology 2013;14 (5):461–482.
47. Maksimenko A. V. Experimental antioxidant biotherapy for protection of the vascular wall by modified forms of superoxide dismutase and catalase. Curr Pharm Design 2005;11 (16):2007–2016.
48. Maksimenko A. V., Vavaev A. V. 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 Int 2012;7 (1):14–19.
49. Martinez Mdel C., Afonso S. G., Buzaleh A. M., Batlle A. Protective action of antioxidant on hepatic damage induced by griseofulvin. Scientific World J 2014;2014:982358.
50. Hide D., Ortega-Ribera M., Fernandez-Iglesias A. et al. A novel form of the human manganese superoxide dismutase protects rat and human livers undergoing ischemia and reperfusion injury. Clin Sci (London) 2014;127 (8):527–537.
51. Mansuroglu B., Derman S., Yaba A., Kizilbey K. Protective effect of chemically modified SOD on lipid peroxidation and antioxidant status in diabetic rats. Int J Biol Macromol 2015;72:79–87.
52. Wang J., Zhang H., Zhang T. et al. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. Int J Biol Macromol 2015;77:59–67.
53. Hood E. D., Chorny M., Greineder C. F. et al. Endothelial targeting of nanocarriers loaded with antioxidant enzymes for protection against vascular oxidative stress and inflammation. Biomaterials 2014;35 (11):3708–3715.
54. Weissig V., Guzman-Villanueva D. Nanocarrier-based antioxidant therapy: promise or delusion? Expert Opin Drug Deliv 2015;12 (11):1783–1790.
55. Richard P. U., Duskey J. T., Stolarov S. et al. New concepts to fight oxidative stress: nanosized three-dimensional supramolecular antioxidant assembles. Expert Opin Drug Deliv 2015;12 (9):1527–1545.
56. Lewis D. R., Petersen L. K., York A. W. et al. Nanotherapeutics for inhibition of atherogenesis and modulation of inflammation in atherosclerotic plaques. Cardiovasc Res 2016;109:283–293.
57. Yan F., Mu Y., Yan G., et al. Antioxidant enzyme mimics with synergism. Mini Rev Med Chem 2019;10 (4):342–356.
58. Maksimenko A. V. Widening and elaboration of consecutive research into therapeutic antioxidant enzyme derivatives. Oxid Med Cell Longevity 2016; http://dx.doi.org/10.1155/2016/3075695.
59. 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.
60. Ylä-Herttuala S., Sumuvuori H., Karkola K. et al. Glycosaminoglycans in normal and atherosclerotic human coronary arteries. Lab Invest 1986;54 (4):402–407.
61. Kolodgie F. D., Burke A. P., Farb A. et al. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesion: insight into plaque erosion. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22 (10):1642–1648.
62. Wight T. N., Marrilees M. J. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key role for versican. Circ Res 2004;94 (9):1158–1167.
63. Luangwattanaun P., Yainoy S., Eiamphungporn W. et al. Engineering of novel tri-functional enzyme with MnSOD, catalase and cell-permeable activities. Int J Biol Macromol 2016;85:451–459.
64. Karaduleva E. V., Mubarakshina E. K., Sharapov M. G. et al. Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins in retrograde perfusion of isolated rat heart under conditions of oxidative stress. Bull Exp Biol Med 2016;160 (5):639–642. Russian (Карадулева Е. В., Мубаракшина Э. К., Шарапов М. Г. и др. Кардиопротекторный эффект модифицированных пероксиредоксинов при ретроградной перфузии изолированного сердца крысы в условиях окислительного стресса. Бюлл экспер биол мед 2015;160 (11):584–588).
65. Pantrelli G., Halliday I., Spencer T. J. et al. Modelling the glycocalyx-endothelium-erythrocyte interaction in the microcirculation: a computational study. Comput Metods Biomech Biomed Engin 2015;18 (4):351–361.
66. Grant O. C., Tessier M. B., Meche L. et al. Combining 3D structure with glycan array data provides insight into the origin of glycan specificity. Glycobiology 2016; doi: 10/1093/glycob/cww020.
67. Agostino M., Gandhi N. S., Mancera R. L. Development and application of site mapping methods for the design of glycosaminoglycans. Glycobiology 2014;24 (9):840–851.
68. Sankaranarayanan N. V., Desai U. R. Toward a robust computational screening strategy for identifying glycosaminoglycan sequences that display high specificity for target proteins. Glycobiology 2014;24 (12):1323–1333.
69. Jayakanthan M., Jubendradass R., D'Cruz S. C., Mathur P. P. A use of homology modeling and molecular docking methods: to explore binding mechanisms of nonylphenol and bisphenol A with antioxidant enzymes. Methods Mol Biol 2015;1268:273–289.
70. Maksimenko A., Turashev A., Fedorovich A. et al. Hyaluronidase proof for endothelial glycocalyx as partaker of microcirculation disturbances. J Life Sci 2013;7 (2):171–188.

71. Maksimenko A. V., Turashev A. D., Beabealashvili R. S. Stratification of chondroitin sulfate binding sites in 3D-model of bovine testicular hyaluronidase and effective size of glycosaminoglycan coat of the modified protein. Biochemistry (Moscow) 2015;80 (3):284–295. Russian (Максименко А. В., Турашев А. Д., Бибилашвили Р. Ш. Стратификация центров присоединения хондроитинсульфата к ферменту на 3D модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы и эффективный размер гликозаминогликановой оболочки модифицированного белка. Биохимия 2015;80(3):348–357).

72. Chao K. L., Muthukumar L., Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. Biochemistry 2007;46:6911–6920.

73. Tatara Y., Kakizaki I., Suto S. et al. Chondroitin sulfate cluster of epiphycan from salmon nasal cartilage defines binding specificity to collagens. Glycobiology 2015;25 (5):557–569.

Поступила 12.12.16 (Received 12.12.16)