



УДК 615.355:577.152.429

## РЕГУЛЯЦИЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ГЕПАРИНОМ ГИАЛУРОНИДАЗЫ ПОСРЕДСТВОМ ЕЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

© 2000 г. А. В. Максименко<sup>#</sup>, М. Л. Петрова, Е. Г. Тищенко, Ю. В. Щечилина*Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического  
научно-производственного комплекса МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15А*

Поступила в редакцию 15.09.99 г. Принята к печати 25.01.2000 г.

Модификация гиалуронидазы альдегиддекстраном регулирует ингибирование фермента гепарином. Резкие конформационные изменения фермента, происходящие при 70–90%-ной степени модификации его поверхностных аминогрупп, существенно снижают гепариновое ингибирование; производные гиалуронидазы со степенью модификации 96–100% практически не ингибируются.

*Ключевые слова:* гиалуронидаза; альдегиддекстран; модификация ферментов; гепариновое ингибирование; регуляция ферментативной активности.

### ВВЕДЕНИЕ

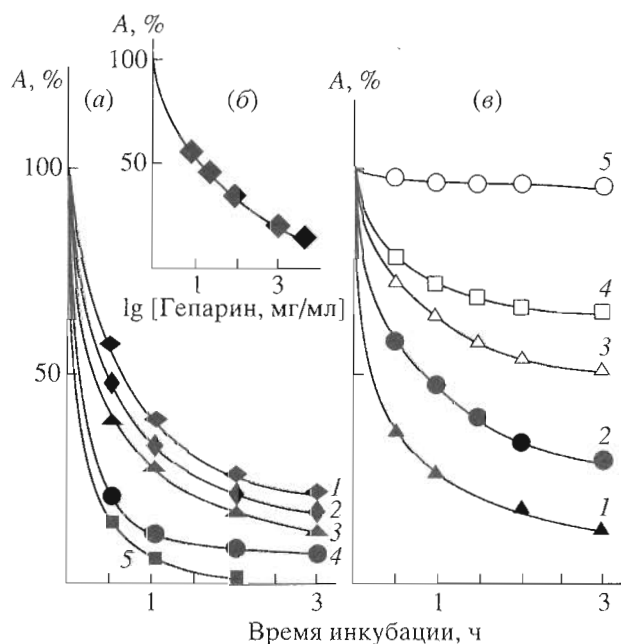
Полисахаридные структуры входят в состав многих биологически активных веществ и могут регулировать функционирование биосистем. Так, гепарин существенно повышает эффективность ингибирования тромбина в кровотоке антитромбином III [1]. Углеводная часть гликопротеинов, имеющих как природное (тканевый активатор плазминогена [2]), так и синтетическое происхождение (модифицированная моно- или полисахаридами супероксиддисмутаза [3]), определяет во многом клиренс таких конъюгатов клетками печени. Высокомолекулярная гиалуроновая кислота (молекулярная масса более 750 кДа) в местах поражения тканей может образовывать комплексы с фибриногеном, способствуя замедлению фибринолиза [4, 5]. Устранение такого неблагоприятного эффекта требует присутствия гиалуронидазной активности. Однако и сам носитель этой активности – гиалуронидаза – ингибируется в организме сульфатированными мукополисахаридами [6]. Последствия гиалуронидазного ингибирования могут быть и негативными [4] и позитивными. Например, ингибирование гиалуронидазы флавоноидами [7] обуславливает их использование как противоядия при ядовитых укусах. Вместе с тем ингибирование гиалуронидазы малоизучено, и последовательного исследования регуляции каталитической активности этого фермента пока не проведено.

Гиалуронидаза – глобулярный фермент гликозидазного действия, деполимеризующий в организме гиалуроновую кислоту, уменьшая ее вязкость и повышая тканевую проницаемость. В России гиалуронидаза, под коммерческим названием “Лидаза”, разрешена для клинического использования (путем

подкожных инъекций) при лечении заболеваний суставов, в дерматологии и офтальмологии [8].

Предполагалось, что гиалуронидаза станет лекарственным агентом, предназначенным для уменьшения размера инфаркта миокарда, поскольку обнадеживающие данные были продемонстрированы на животных (см. литературу к [9]). Однако клинические исследования (9450 пациентов, 1978–1983 годы) не обнаружили достоверного отличия в действии внутривенно введенной нативной гиалуронидазы по сравнению с показателями группы плацебо-пациентов (введение сывороточного альбумина) [9]. Как возможные причины отсутствия упомянутого эффекта называли позднее начало терапии [10], не вполне продуманную организацию и составление протокола испытаний [11], а также ингибирование нативной тестикулярной гиалуронидазы гепарином [12]. Актуальность поиска средств, уменьшающих размер инфаркта миокарда у пациентов, не ослабевает. Поэтому для этой роли предлагалась гиалуронидаза пиявок [11], которая не ингибируется гепарином. Также было показано, что сочетанное введение крысам с инфарктом миокарда гиалуронидазы (2500 МЕ/кг) с урокиназой (40000 МЕ/кг) достоверно снижает уровень смертности до 12.5% против 29.5% в случае введения одной урокиназы [13]. Более того, методом позитронной эмиссионной томографии обнаружено, что после успешного тромболитического окклюзированного сосуда тканевая проницаемость у пациентов с острым инфарктом миокарда ухудшена из-за нарушения микроциркуляции, вызванного ишемией и реперфузией [14]. Функциональное восстановление миокарда наблюдается только при адекватном восстановлении тканевой проницаемости/тканевого потока, что требует дополнительной терапии. Для такой терапии могли бы быть полезны пре-

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (095) 415-29-62; e-mail: cclibr@transt.ru).



**Рис. 1.** Влияние гепарина на ферментативную активность гиалуронидазы. (а) Зависимость активности нативной гиалуронидазы от времени инкубации фермента при разных весовых соотношениях гиалуронидазы и гепарина: 1 – 1 : 15, 2 – 1 : 25, 3 – 1 : 100, 4 – 1 : 1000, 5 – 1 : 5000. (б) Остаточная активность нативной гиалуронидазы после получасовой инкубации фермента с гепарином в различных концентрациях. (в) Остаточная активность нативной гиалуронидазы (1) и ее производных со степенью модификации 20% (2), 80 (3), 90 (4), 98% (5) после инкубации с гепарином при соотношении фермента и гепарина (по весу) 1 : 100.

параты, обладающие гиалуронидазной активностью. Эти данные подчеркивают важность поиска способов регуляции ингибирования гиалуронидазы в биосистемах.

Ранее нами было показано, что в результате ковалентного присоединения гиалуронидазы через ее поверхностные функциональные аминокислотные группы к альдегиддекстрану повышается стабильность фермента в физиологических условиях [15]. Благодаря этому препарат проявляет выраженное тормозящее действие на развитие экспериментального силикоза у крыс [16]. При этом нативный фермент совсем не оказывал терапевтического эффекта. Используемая модификация снижала действие ингибиторов и способствовала успешному сочетанному применению модифицированных альдегиддекстраном гиалуронидазы и супероксиддисмутазы [17], открывая путь к разработке эффективных приемов энзимотерапии [18].

Химическая модификация гиалуронидазы делает ее пригодной для системного ингаляционного введения [16] и, возможно, для введения в кровоток. В связи с этим изучение последовательной химической модификации поверхностных аминокислотных групп гиалуронидазы представляется перспектив-

ным для выяснения влияния такой модификации на ингибирование фермента гепарином. В качестве модификатора мы выбрали альдегиддекстран, клинически уже используемый ранее [8].

Цель настоящей работы – изучение регуляции ингибирования гиалуронидазы гепарином посредством химической модификации фермента альдегиддекстраном.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нативная гиалуронидаза весьма эффективно ингибируется гепарином (рис. 1а): с увеличением весового соотношения гепарин/гиалуронидаза увеличивается и ингибирование фермента. Видно, что получасовая инкубация с гепарином существенно снижает гиалуронидазную активность (рис. 1б).

Для сравнения ингибирующего действия гепарина на активность обработанных альдегиддекстраном производных гиалуронидазы с разной степенью модификации аминокислотных групп мы выбрали такие условия, которые обеспечивают заметное ингибирование нативного биокатализатора при концентрациях реагентов, близких к физиологическим (см. рис. 1а, кривая 3). Оказалось, что с увеличением степени модификации гиалуронидазы степень ее ингибирования гепарином уменьшается (рис. 1в). Наименее подвержены ингибированию производные с наибольшей (почти предельной) степенью модификации аминокислотных групп (96–98% показателя нативного фермента).

Ранее показано, что гиалуронидазные производные даже с низкой степенью модификации и остаточной ферментативной активностью 90–100% обладают увеличенной термостабильностью [15]. Это свидетельствует об определенной стабилизации белковой структуры в результате ее химической модификации.

С увеличением степени модификации гиалуронидазы, как было обнаружено, активность модифицированного производного монотонно уменьшается (рис. 2а). С другой стороны, способность к ингибированию у модифицированного производного меняется не монотонно: при степени модификации более 70% наблюдается скачкообразное увеличение устойчивости к ингибированию (рис. 2б). Наиболее глубоко модифицированные (90–100%) производные гиалуронидазы практически не ингибировались гепарином. Эти данные наглядно свидетельствуют о возможности регуляции гепаринового ингибирования гиалуронидазы путем изменения степени химической модификации ее поверхностных аминокислотных групп. Вероятно, в основе этого эффекта лежат изменения, вносимые химической модификацией в нативную структуру биокатализатора.

Ранее отмечалось, что последовательная модификация аминокислотных групп химотрипсина приводит к резкому повышению термостабильности фермента. При этом модификация именно труднодоступных аминокислотных групп (при степени модификации

более 70%) вызывает максимально заметные эффекты. В их основе лежат существенные конформационные изменения, индуцированные химической модификацией [19]. Это побудило нас к проведению спектрофлуориметрического изучения производных гиалуронидазы.

Интенсивность собственной флуоресценции белка является чувствительным тестом изменения его структурной организации. Установлено, что относительная интенсивность собственной флуоресценции полученных препаратов гиалуронидазы при равной концентрации белка имеет сложную зависимость от степени модификации фермента (рис. 3а). Видно, что при степени модификации более 60% происходят существенные конформационные перестройки. Можно полагать, что именно в результате этих конформационных изменений (рис. 3а) достигается резкое и заметное снижение гепаринового ингибирования (рис. 2б).

Подтверждают этот вывод и данные спектрофлуориметрического изучения гепаринового ингибирования. Эксперимент состоял в определении зависимости интенсивности собственной флуоресценции разных производных гиалуронидазы (при одинаковой концентрации белка) в присутствии возрастающих концентраций гепарина (титрование гепарином). Полученные для каждого производного кривые тушения белковой флуоресценции гепарином спрямляли в полулогарифмических координатах (интенсивности флуоресценции от десятичного логарифма концентрации гепарина) и определяли тангенс угла начального участка такой прямой. Величина этого тангенса пропорциональна изменениям, происходящим в структуре фермента в присутствии возрастающих концентраций гепарина и регистрируемым по значению интенсивности собственной флуоресценции белковых производных.

Мы показали, что зависимость полученных значений тангенса ( $\text{tg } \varphi$ ) от степени модификации гиалуронидазы (рис. 3б) весьма сходна с ранее полученной кривой без гепарина (рис. 3а). Отмеченное сходство определенно указывает на лимитирующую роль конформационных изменений, вызванных в структуре гиалуронидазы модификацией (при степени модификации более 70%), в отношении уменьшения гепаринового ингибирования. Сделанное заключение подтверждается тем фактом, что при SDS-электрофорезе модифицированные производные с небольшой (20–40%) и существенной (60–100%) степенью модификации не различаются по положению полос на фореграмме (данные не представлены). Это означает, что с увеличением степени модификации гиалуронидазы не происходит ковалентного присоединения дополнительных молекул альдегиддекстера (это привело бы к заметному различию в расположении полос производных при форефорезе). Вероятно, в уже образовавшейся (при небольшой степени модификации) области контакта фер-

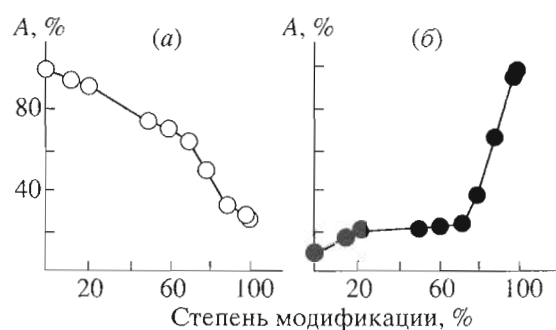


Рис. 2. Зависимость ферментативной активности гиалуронидазы от степени ее модификации альдегиддекстраном (а) и остаточная активность производных гиалуронидазы с разной степенью модификации после часовой инкубации с гепарином при весовом соотношении фермента и гепарина 1 : 1000 (б).

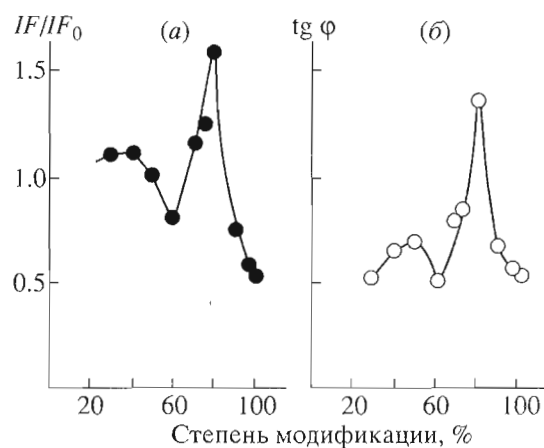


Рис. 3. Данные спектрофлуориметрического изучения производных гиалуронидазы. (а) Влияние степени модификации гиалуронидазы на величину относительной интенсивности ( $IF/IF_0$ ) ее собственной флуоресценции,  $IF_0$  и  $IF$  – интенсивность флуоресценции для нативного и для конкретного производного гиалуронидазы. (б) Изменение структурной организации гиалуронидазы ( $\text{tg } \varphi$ ) при взаимодействии с возрастающими концентрациями гепарина (пояснение см. в тексте) для производных фермента с разной степенью модификации.

мента с полисахаридом развиваются новые взаимодействия, затрагивающие наиболее скрытые в нативном виде аминокислотные группы биокатализатора. Они становятся пригодными для взаимодействия с полимерным реагентом в результате происходящих конформационных изменений белка. Этот результат, в сочетании с приведенными выше данными, указывает на особую важность модификации труднодоступных аминокислотных групп гиалуронидазы для регуляции ее гепаринового ингибирования.

Можно полагать, что последовательная химическая модификация гиалуронидазы по ее поверхностным аминокислотным группам окажется действенным приемом для дальнейшего исследования

биохимии гепаринового ингибирования этого фермента и для разработки эффективных лекарственных препаратов гиалуронидазы, улучшающих тканевый поток и пригодных для системного введения в кровотоки.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: гиалуронидазу, выделенную на колонке сефадекса G-100 (Pharmacia, Швеция) из коммерческого препарата "Лидаза" (НПО "Иммунопрепарат", Уфа, Россия); декстран M 35–50 кДа (Nutritional Biochemicals Corp., США). Калиевая соль гиалурононовой кислоты (M 700–800 кДа) из пуповины человека, тринитробензосульфокислота (TNBS), периодат натрия, натриевая соль гепарина (бычьего происхождения), боргидрид натрия, хлористый натрий, SDS (Sigma, США). Все остальные реактивы отечественного производства аналитической степени чистоты.

**Альдегиддекстран** получали методом частичного периодатного окисления декстрана [20]. Полученный альдегиддекстран, по данным иодометрии, содержал 20–22 альдегидные группы на 100 моносахаридных звеньев полимерной цепи.

Содержание белка в препаратах определяли по методу Брэдфорд [21].

**Ферментативную активность гиалуронидазы** определяли вискозиметрически в соответствии с работой [22]. Для этого 1 мл 0.02% раствора гиалуроната калия в 0.1 М фосфатном буфере pH 5.45, содержащем 0.15 NaCl, в вискозиметре Оствальда В-434 (США) помещали в погружной термостат при 37°C. После 5 мин инкубации в вискозиметр вносили 20 мкл раствора нативной или модифицированной гиалуронидазы в том же буферном растворе (концентрация по белку 0.2 мг/мл) и начинали отсчет времени реакции (*t*) фермента с субстратом. Периодически в течение 15–20 мин определяли время истечения ( $\tau$ ) реакционной смеси из резервуара вискозиметра. На основе этих данных (набор значений) рассчитывали величину относительной вязкости, представляющей собой отношение времени истечения реакционной смеси ко времени истечения буферного раствора субстрата без фермента. Тангенс угла наклона прямой в координатах обратный логарифм относительной вязкости

против времени измерения  $\left(t + \frac{\tau}{2}\right)$  пропорциона-

лен величине скорости ферментативной реакции [15]. Это значение тангенса дает относительную величину скорости деструкции гиалурононовой кислоты под действием гиалуронидазы.

**Ковалентная модификация гиалуронидазы** альдегиддекстраном была выполнена по ранее использованной схеме [15, 16]. В растворе 0.1 М фосфатного буфера pH 8.3, содержащего 0.15 М NaCl, инкубировали при 4°C гиалуронидазу с альдегиддекстраном. Концентрация гиалуронидазы в инку-

бационной смеси составляет 10 мкМ, а альдегиддекстрана 20–200 мкМ. Время инкубации варьировалось от 0.5 до 18 ч. После этого проводили восстановление образующихся оснований Шиффа боргидридом натрия (~10 мг/мл) на холоду в течение 30–40 мин и полученные аддукты выделяли ультрафильтрационно на установке "Amicon" (США) с мембраной ХМ-100, а затем лиофилизовали. Показана равноценность кинетических путей получения модифицированных форм гиалуронидазы с одинаковой степенью модификации варьированием либо концентрации альдегиддекстрана в реакционной смеси (при одном и том же времени инкубации), либо времени инкубации смеси (при фиксированной концентрации модификатора).

**Степень модификации гиалуронидазы** определяли титрованием поверхностных аминогрупп фермента тринитробензосульфокислотой, используя модифицированный метод [23]. За исходный показатель приняты данные нативного фермента, полное отсутствие титруемых аминогрупп гиалуронидазы означает ее 100%-ную степень модификации.

**Спектрофлуориметрические измерения** проводили на спектрофлуориметре Hitachi F-4010 (Япония) при длине волны возбуждения 280 нм, испускания 348 нм и при одинаковой концентрации белка (0.2 мг/мл). Это значение находится внутри концентрационного интервала (0.05–2.0 мг/мл), где соблюдается пропорциональность интенсивности флуоресценции гиалуронидазы от ее концентрации. Измерение величины интенсивности собственной флуоресценции фермента проводили при pH 7.5 (0.02 М фосфатный буфер, содержащий 0.15 М NaCl) и комнатной температуре. Гепарин и соли буферных растворов собственной флуоресценцией в этих условиях не обладают.

**Ингибирование активности препаратов гиалуронидазы гепарином.** Раствор фермента в 0.02 М фосфатном буфере с 0.15 М NaCl, pH 7.5 (0.2 мг белка в мл) инкубировали с гепарином (2–200 мг/мл) при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (20 мкл) и определяли остаточную ферментативную активность как описано выше.

Время инкубации гиалуронидазы с гепарином существенно не влияло на величину интенсивности собственной флуоресценции производных фермента, используемых при одинаковых белковых концентрациях проб в кювете (0.2 мг/мл). Интенсивность собственной флуоресценции производных гиалуронидазы определяли после 0.5 ч инкубации с гепарином в концентрации (2–200 мг/мл) в 0.02 М фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 0.15 М NaCl, и комнатной температуре (титрование гепарином).

**Электрофорез** осуществляли в 5–20% SDS-ПААГ [24]. Показано наличие ковалентной модификации гиалуронидазы альдегиддекстраном и отсутствие достоверных количеств межмолекулярно сшитого фермента.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы искренне благодарны академику Е.И. Чазову, чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову, профессору Н.И. Афонской (ММА им. И.М. Сеченова), А.В. Левашову и Н.Л. Клячко (МГУ им. М.В. Ломоносова) за поддержку данного исследования и весьма признательны за стимулирующее научное сотрудничество в изучении гиалуронидазы проф. А. Лауверсу и проф. И. Демеестеру (Университет Гента, Бельгия) и проф. К. Бални (отделение ИНСЕРМ U 128, Монпелье, Франция). Благодарим за помощь в экспериментальной работе сотрудников лаборатории биохимической инженерии Кардицентра Л.И. Баранову и Г.В. Мартакову.

Настоящая работа частично финансировалась из средств Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-48747), а также министерством здравоохранения Российской Федерации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bourin M.-C., Lindahl U. // *Biochem. J.* 1993. V. 289. P. 313–330.
2. Otter M., Kuiper J., Bos R., Rijken D.C., van Berkel T.J.C. // *Biochem. J.* 1992. V. 284. P. 545–550.
3. Fujita T., Furitsu H., Nishikawa M., Takakura Y., Sezaki Y., Hashida M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. P. 191–196.
4. LeBoeuf R.D., Raja R.H., Fuller G.M., Weigel P.H. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 12568–12592.
5. Scully M.F., Kakkar V.V., Goodwin C.A., O'Regan M. // *Thromb. Res.* 1995. V. 78. P. 255–258.
6. Afify A.M., Stern M., Guntenhoner M., Stern R. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. V. 305. P. 434–441.
7. Kuppasamy U.P., Das N.P. // *Experientia.* 1991. V. 47. P. 1196–1200.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 1984. Т. II. С. 64–65, 59–60.
9. MILIS Study Group. // *Am. J. Cardiol.* 1986. V. 57. P. 1236–1243.
10. Roberts R., Braunwald E., Muller J.E., Croft C., Gold H.K., Hartwell T.D., Jaffe A.S., Mullin S.M., Parker C., Passamani E.R., Poole W.K., Robertson T., Raabe D.S., Jn., Rude R.E., Stone P.H., Turi Z.G., Sobel B.E., Willerson J.T. // *Br. Heart J.* 1988. V. 60. P. 290–298.
11. Jones C.P., Sawyer R.T. // *Thromb. Res.* 1989. V. 55. P. 791–796.
12. Wolf R.A., Glogar D., Chaung L.-Y., Garrett P.E., Ertl G., Tumas J., Braunwald E., Kloner R.A., Feldstein M.L., Muller J.T. // *Am. J. Cardiol.* 1984. V. 53. P. 941–944.
13. Borrelli F., Antonetti F., Martelli F., Caprino L. // *Thromb. Res.* 1986. V. 42. P. 153–164.
14. Macs A., van de Werf F., Nuys J., Bormans G., Desmet W., Mortelmans L. // *Circulation.* 1995. V. 92. P. 2072–2078.
15. Максименко А.В., Коновалова О.Ю., Бердичевский В.П., Архинова О.Г., Торчилин В.П. // *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1986. Т. 102. С. 567–569.
16. Maksimenko A.V., Arkhipova O.G., Yaglov V.V., Torchilin V.P. // *Interbiotech'87. Enzyme Technologies* / Eds A. Blazej, J. Zemek. Amsterdam: Oxford; New York; Tokyo: Elsevier, Progress in Biotechnology, 1988. V. 4. P. 509–522.
17. Максименко А.В., Безрукавникова Л.М., Григорьева Е.Л., Петров А.Д., Тищенко Е.Г., Яглов В.В., Торчилин В.П. // *Хим.-фарм. журнал.* 1993. Т. 27. С. 11–13.
18. Maksimenko A.V., Bezrukavnikova L.M., Grigorieva E.L., Petrov A.D., Tischenko E.G., Yaglov V.V., Torchilin V.P. // *Biochemical Engineering for 2001* / Eds S. Furusaki, I. Endo, R. Matsuno. Tokyo; Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Hong Kong; Barcelona: Springer-Verlag, 1992. P. 646–648.
19. Torchilin V.P., Maksimenko A.V., Smirnov V.N., Berezin I.V., Klibanov A.M., Martinek K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. V. 567. P. 1–11.
20. Torchilin V.P., Maksimenko A.V., Mazaev A.V. // *Methods in Enzymology* / Ed. K. Mosbach. San Diego; New York; Berkeley; Boston; London; Sydney; Tokyo; Toronto: Acad. Press, 1988. V. 137. P. 552–566.
21. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–354.
22. Vercruyse K.P., Lauwers A.R., Demeester J.M. // *Biochem. J.* 1995. V. 305. P. 153–160.
23. Sprado A.A.C., Draghetta W., Dellama S.N., Camargo A.C.M., Greene L.J. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 96. P. 317–321.
24. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

## Chemical Modification of Hyaluronidase As a Means to Regulate Its Inhibition by Heparin

A. V. Maksimenko<sup>#</sup>, M. L. Petrova, E. G. Tischenko, and Yu. V. Shchepochina

*Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research Center,  
Ministry of Health of the Russian Federation, Tret'ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia*

The modification of hyaluronidase by aldehydodextran regulates inhibition of the enzyme by heparin. A 70–90% modification of the surface amino groups of hyaluronidase results in sharp conformational changes and a substantial decrease of its inhibition by heparin, whereas hyaluronidase derivatives with a modification degree of 96–100% are practically uninhibited.

*Key words: aldehydodextran, enzyme modification, enzymic activity regulation, heparin inhibition, hyaluronidase*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 415-2962; e-mail: cclibr@transt.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.