

УДК 61:612.272.3

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РАЗРЫВАТЕЛЕЙ ПОПЕРЕЧНЫХ СШИВОК ГЛИКИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

**А. А. Спасов, А. И. Ращенко**

*Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра фармакологии*

Неферментативное гликирование белков принимает участие в процессах развития осложнений сахарного диабета (ангиопатии, катаракты, ретинопатии, нефропатии и т. д.), болезни Альцгеймера (образование нейротоксичного гликированного  $\beta$ -амилоида) и онкологических заболеваний. Данный процесс задействован и при физиологическом старении организма. В настоящее время актуальным остается вопрос создания лекарственных средств, способствующих восстановлению функции структурных белков.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, конечные продукты гликирования, разрыватели поперечных сшивок.

## THERAPEUTIC POTENTIAL OF CROSSLINK BREAKERS

**A. A. Spasov, A. I. Rashchenko**

*Volgograd State Medical University, department of pharmacology*

Non-enzymatic glycation of proteins is involved in the development of diabetes complications (angiopathy, cataract, retinopathy, nephropathy, etc.), Alzheimer's disease (glycated formation of neurotoxic  $\beta$ -amyloid) and cancer. This process is also involved in the physiological aging of the body. To date, the development of drugs that contribute to the restoration of the structure and functions of structural proteins remains a pressing issue.

*Key words:* diabetes, advance glycation end products, crosslink breakers.

Долгоживущие структурные белки подвергаются постоянному неферментативному сшиванию с глюкозой в процессе старения у больных сахарным диабетом [1]. Неферментативное гликирование усиливается при диабете благодаря гипергликемии и приводит к различным осложнениям данной болезни [1, 14].

Неферментативное гликирование является классической ковалентной реакцией, в которой посредством N-гликозидного связывания образуется сахар-протеиновый комплекс через серию химических реакций, описанных химиком Майяром [1]. Эти реакции протекают в течение нескольких часов, когда ранее образованное лабильное основание Шиффа перегруппировывается в более стабильный продукт Амадори [10]. Продукты ранней стадии гликирования Амадори-модифицированные белки могут подвергаться дальнейшим реакциям, включающим образование дикарбонильных интермедиатов, таких как 3-дезоксиглюкозоны (3-ДГ), глиоксаль, метилглиоксаль, приводящих к увеличению необратимых продуктов, названных продуктами завершеного гликирования ПЗГ [1, 14]. Эти реактивные промежуточные продукты вызывают сшивку гликированного белка через -SH и -NH<sub>2</sub> группы с соседними белками или в доменах того же самого белка и образуют необратимые конечные продукты гликирования (КПГ) [14].

Исследования *in vitro* показали, что гликированные белки, прошедшие реакцию Майяра, становятся поперечно-сшитыми, при этом белок полимеризуется и образуются до сих пор плохо охарактеризованные бурые и флуоресцирующие соединения [7]. Формирование конечных продуктов гликирования из продукта Амадори происходит медленно — в течение месяцев и лет [14]. Таким образом, только белки с длительным периодом полураспада, такие как коллаген, будут накапливать значительное количество ПЗГ в естественных условиях. КПГ остаются тесно связаны с белками и образуют внутри- и межмолекулярные перекрестные сшивки с соседними белками. Имеются доказательства существования таких реакций в организме [1, 14]. В последние годы были проведены интенсивные исследования по гликированию *in vitro* белков, инкубированных с высокими концентрациями глюкозы, таких как белок хрусталика глаза кристаллин, инсулин, белки мембран эритроцитов, бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин, ферменты, липопротеины высокой и низкой плотности, миелин периферических нервов, эластин, коллаген, IgM и IgG. Неферментативному гликированию *in vitro* подвергались также некоторые другие белки [1, 3].

Неферментативное гликирование белков, пептидов и других макромолекул связывают с рядом патологий,

наиболее часто с диабетом, нормальным старением и нейродегенеративной амилоидной болезнью, такой как болезнь Альцгеймера. Многочисленные исследования доказывают определенную связь между гипергликемией и патогенезом диабетических осложнений, таких как ретинопатия, нефропатия, нейропатия и васкулопатия (рис. 1) [1, 5, 4]. Поперечное сшивание белков, как правило, приводит к тому, что они становятся менее эластичными. Клетки крови, сосуды, кожа становятся жесткими и теряют свою функциональность. У здоровых людей, по мере старения, этот процесс происходит медленно. Однако у больных сахарным диабетом скорость накопления КПГ и степень перекрестного связывания белка ускоряются из-за воздействия повышенной концентрации глюкозы. Многочисленные исследования установили роль ПЗГ в развитии офтальмологических, неврологических и сердечно-сосудистых осложнений при диабете и старении [14].

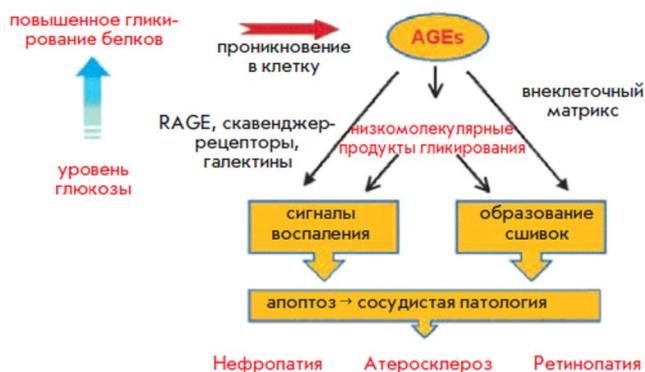


Рис. 1. Продукты глубокого гликирования белков

Главными биологическими эффектами интенсивного гликирования являются: ингибирование связывания регуляторных молекул, поперечная сшивка гликированных белков, ловля растворимых белков гликированным внеклеточным матриксом, снижение восприимчивости к протеолизу, инактивация ферментов, аномалии функции нуклеиновых кислот и усиленная иммуногенность в отношении образования иммунных комплексов. В организме нет ферментов, способных гидролизовать ПЗГ соединения, в результате чего ПЗГ-модифицированные белки являются необратимыми продуктами [1, 12].

Потенциальные стратегии лечения осложнений, приобретенных в результате гликирования белков, включают профилактику образования конечных продуктов гликирования и разрушение существующих сшивок. Терапевтический потенциал антигликирующих препаратов, таких как аминокетонидин, широко исследовали в эксперименте, и в настоящее время данный препарат находится на 3-й фазе клинических испытаний [14]. В данном обзоре представлены доклинические и клинические исследования разрывателей поперечных сшивок.

Одним из последствий старения и диабета является увеличение жесткости коллагеновой основы сердечно-сосудистой системы [14].

Крупные артерии теряют свою эластичность и становятся жесткими, что приводит к систолической гипертонии и, в конечном итоге, сердечной недостаточности. Эти изменения связаны с количественными и структурными изменениями в миокардиальных матричных белках, которые состоят, главным образом, из коллагена типа I и III, в малом количестве IV, V и VI типа, а также эластина. Почти 80 % сердечного коллагена составляет I тип, который существует в виде толстых волокон. Волокна коллагена типа III составляют 10 %, а все остальные типы — 10 % [14].

Неферментативное гликозилирование коллагеновой матрицы происходит постепенно, как в процессе старения, так и при диабете. Одним из последствий перекрестного связывания коллагена является сниженная восприимчивость к протеолитическому и химическому разложению. Это приводит к повышенному накоплению поперечно сшитого коллагена, потере его эластичности и, как результат, к ИБС [14]. Результаты многочисленных исследований подтверждают мнение, что инфаркт является итогом гликирования коллагеновой матрицы [7, 14].

Диабетическая ретинопатия является одним из основных осложнений диабета с весьма сложной этиологией. Установлено, что хроническое УФ-облучение сетчатки и гипергликемия приводят к накоплению конечных продуктов гликирования, которые играют важную роль в развитии ретинопатии. Среди взрослого населения США страдающих диабетом распространенность ретинопатии составляет 28,5 %. По данным Всемирной организации здравоохранения, среди более 220 млн людей с диабетом во всем мире, после 15 лет наличия данной патологии, примерно 2 % людей становятся слепыми и у около 10 % развиваются тяжелые нарушения зрения [15].

Также известно, что нейротоксичный  $\beta$ -амилоид принимает непосредственное участие в развитии болезни Альцгеймера. Однако гликирование данного белка приводит к повышению его токсичности и, как следствие, к повышению риска развития деменции у лиц, страдающих диабетом. Так, при инкубировании  $\beta$ -амилоида с метилглиоксалем и последующем культивировании комплекса белок-углевод к основным нейронам гиппокампа наблюдалось увеличение нейротоксичности гликированного протеина [8].

Влияние неферментативного гликирования белков и накопление в сыворотке и тканях ПЗГ распространилось и на онкологические заболевания. Присутствие аутоантител, специфичных к продуктам Амадори, при онкологии может быть шагом в раннем определении болезни и может рассматривать гликированные продукты как общие биомаркеры онкологических болезней. Ингибирование образования продуктов Амадори может быть новым и эффективным терапевтическим средством при данной широкой группе патологий [1].

Способность разрывателей поперечных сшивок разрушать КПГ является возможным терапевтическим

подходом к восстановлению эластичности коллагенового каркаса сердечно-сосудистой системы, а также к лечению других осложнений сахарного диабета. В 1996 г. впервые были опубликованы данные о N-фенилтиазол бромиде (ФТБ) [7, 13]. Купер и др. [11] исследовали влияние ФТБ на сосудистую гипертрофию у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Внутривнутрибрюшинное введение ФТБ привело к снижению КПГ, накопленных в кровеносных сосудах. Ввиду нестабильности фенилтиазол-бромидов в физиологических буферах был протестирован его аналог — ALT-711 (алаге-бриум) (рис. 2) [14].

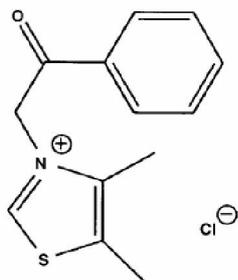


Рис. 2. Структура разрывателя поперечных сшивок — алагeбриума

Алагeбриум является более стабильным, чем его предшественник ФТБ. Кроме того, в исследованиях было показано, что ALT-711 активнее фенилтиазол-бромидов. Так, при ежедневном пероральном введении стрептозотоцин-индуцированным диабетическим крысам алагeбриум снижал количество гликированного IgG на 95 % процентов [14].

Исследования, проведенные на лабораторных животных, указывают на то, что ALT-711 приводит к нормализации сердечно-сосудистой системы после осложнений, вызванных старением и диабетом. Изучение проводилось с использованием недиабетических крыс со спонтанной гипертензией. Было показано, что произошло восстановление эластичности левого желудочка и аорты после перорального введения алагeбриума. Кроме того, при исследовании алагeбриума на старых собаках была установлена нормализация диастолического давления [14].

Фаза 2 клинических испытаний ALT-711 была начата в 1998 г. с участием добровольцев обоих полов и разных возрастных групп. Было показано, что алагeбриум хорошо переносится участниками исследования. Кроме того, наблюдалось увеличение эластичности сосудов у 93 % пациентов старше 50 лет, а также отмечалось статистически значимое снижение пульса по сравнению с пациентами, принимающими плацебо [14].

При местном использовании ALT-711 оказывает влияние на эластичность кожи. Так, увлажняющий лосьон, содержащий алагeбриум в концентрации 5 %, наносили на кожу 24-месячным крысам в течение 3 дней. В результате полученных данных было видно, что в составе кожи увеличилось содержание воды, а также повысилась эластичность кожных покровов по сравнению с контрольной группой крыс [14].

Некоторые исследователи считают, что фармакологическая активность ALT-711 связана с ингибированием формирования поперечных сшивок, нежели их разрыв. Обоснованием этой теории служит исследование Прайса [9], в котором было установлено, что алагeбриум может обладать хелатирующими свойствами (образование хелатов с медью и железом).

Однако другие клинические исследования алагeбриума с участием пациентов с сердечной недостаточностью показали отрицательные результаты. Впоследствии несколько клинических испытаний ALT-711 были остановлены из-за финансовых проблем [7].

Соединение 3-бензилоксикарбонил-метил-4-метилтиазол-3-иум бромид (соединение С36) также является разрывателем поперечных сшивок, и в ряде исследований было показано, что данное вещество оказывает положительное влияние на сердечно-сосудистую систему диабетических крыс [6].

Было обнаружено, что для мономерного флавоноида — соединения эпикатехин — характерны свойства разрывателей поперечных сшивок. Эпикатехин содержится в высокой концентрации во многих фруктах и овощах, особенно в какао и зеленом чае. Так, например, данное вещество снижает уровень гликозилированного гемоглобина в крови диабетических мышей, не страдающих сахарным диабетом [7].

На доклиническом этапе исследования находится ряд соединений, разрушающих поперечные сшивки и, предположительно, проявляющих большую активность, чем алагeбриум. К таким веществам относятся — 3-бензилоксикарбонилметил-4,5-диметил-тиазол-3-бромид, 3-бензилоксикарбонилметил-5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазол-3-бромид, 3-бензилоксикарбонилметил-4-метилтиазол-3-бромид, 3-бензилоксикарбонилметил-4,5,6,7-тетрагидро-бензотиазол-3-бромид, 3-карбоксиметил-4-метил-тиазол-3-бромид. Стоит отметить, что все вышеперечисленные соединения относятся к веществам замещенного 5-членного азацикла [2], как и эталонный препарат ALT-711.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, неферментативное гликирование белков принимает участие во многих процессах осложнения сахарного диабета, таких как ангиопатия, ретинопатия, нефропатия. Кроме того, накопление КПГ может привести к повышению риска развития таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, катаракта, ретинопатия и онкологических заболеваний. Данный процесс задействован и при нормальном физиологическом старении организма, однако с меньшей скоростью. Учитывая важные аспекты генеза развития гликированных поперечных сшивок, разработка лекарственных препаратов, разрывающих данные связи, является актуальной.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ансари Н. А., Рашид З. Неферментативное гликирование белков: от диабета до рака // Биомедицинская химия. — 2010. — Т. 56, №. 2. — С. 168—178.

2. *Ли Сун и др.* Новые соли замещенного 5-членного азацикла и их применение в лечении заболеваний, связанных со старением белков: заявка на пат. № 2008134899/04, Российская Федерация. — 2007.

3. *Спасов А. А., Чепляева Н. И.* Потенциал фармакологической модуляции уровня и активности инкретинов при сахарном диабете типа 2 // Биомедицинская химия. — 2015. — Т. 61, № 4. — С. 488—496.

4. *Щеглова Т., Маккер С. П., Трамонтано А.* Ковалентно-связывающиеся антитела подавляяют глубокое гликирование: врожденный компонент системы приобретенного иммунитета // Acta Naturae (русскаяязычная версия). — 2009. — Т. 1, № 2.

5. *Ahmed N.* Advanced glycation endproducts — role in pathology of diabetic complications // Diabetes research and clinical practice. — 2005. — Т. 67, № 1. — С. 3—21.

6. *Cheng G., et al.* Beneficial effects of C36, a novel breaker of advanced glycation endproducts cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats // British journal of pharmacology. — 2007. — Т. 152, № 8. — С. 1196—1206.

7. *Kim J., et al.* Epicatechin breaks preformed glycated serum albumin and reverses the retinal accumulation of advanced glycation end products // European journal of pharmacology. — 2015. — Т. 748. — С. 108—114.

8. *Li X. H., et al.* Glycation exacerbates the neuronal toxicity of  $\beta$ -amyloid // Cell death & disease. — 2013. — Т. 4, № 6. — С. 673.

9. *Price D. L., et al.* Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors // Journal of Biological Chemistry. — 2001. — Т. 276, № 52. — С. 48967—48972.

10. *Singh R., et al.* Advanced glycation end-products: a review // Diabetologia. — 2001. — Т. 44, № 2. — С. 129—146.

11. *Thornalley P. J., Minhas H. S.* Rapid hydrolysis and slow  $\alpha$ ,  $\beta$ -dicarbonyl cleavage of an agent proposed to cleave glucose-derived protein cross-links // Biochemical pharmacology. — 1999. — Т. 57, № 3. — С. 303—307.

12. *Turk Z.* Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications // Physiological Research. — 2010. — Т. 59, № 2. — С. 147.

13. *Vasan S., et al.* An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. — 1996.

14. *Vasan S., Foiles P., Founds H.* Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product–protein crosslinks // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 2003. — Т. 419, № 1. — С. 89—96.

15. *Zong H., Ward M., Stitt A. W.* AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy // Current Diabetes Reports. — 2011. — Т. 11, № 4. — С. 244—252.

## Контактная информация

**Ращенко Андрей Игоревич** — к. фарм. н., с. н. с. лаборатории фармакологии антиоксидантных средств НИИ фармакологии ВолгГМУ, ассистент кафедры фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: a.rashencko@yandex.ru