

## АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ С ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТОМ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ У КРЫС

А.В. МАКСИМЕНКО, Е.Г. ТИЩЕНКО, В.Л. ГОЛУБЫХ

Институт экспериментальной кардиологии Российского Кардиологического Научно -  
Производственного Комплекса МЗМП РФ, 121 552 Москва, 3-я Черепковская улица 15 А,  
факс (095) 415 - 29 - 62

На модели артериального тромбоза у крыс, индуцированного обработкой сосуда раствором хлористого железа, исследована сравнительная антитромботическая активность препаратов супероксиддисмутазы и хондроитинсульфата по отдельности и в виде ковалентного и нековалентного комплекса. Показано, что наибольший антитромботический эффект вызывает препарат ковалентного конъюгата супероксиддисмутазы с хондроитинсульфатом. Высокая антитромботическая активность ковалентного конъюгата обусловлена его сорбцией на гликокаликсе клеточной поверхности сосудистой стенки и прочностью ковалентной связи между субъединицами супероксиддисмутазы и хондроитинсульфатом. Обоснована перспективность развития данного научно-практического направления исследований.

**Ключевые слова:** супероксиддисмутаза, антиоксиданты, хондроитинсульфат, гликозаминогликаны, гликокаликс, поражение сосудистой стенки.

**ВВЕДЕНИЕ.** Исследования новых антитромботических препаратов весьма актуальны и широки [1-4]. Одно из этих направлений связано с изучением антитромботического потенциала такого антиоксидантного фермента как супероксиддисмутаза (СОД). Этот биокатализатор отвечает в организме за диспропорционирование супероксидрадикалов. Сочетанное введение СОД вместе с тканевым активатором плазминогена улучшало показатели тромбозиса [5,6]. Вовлечение свободнорадикальных процессов в тромбообразование [7], усиление продуцирования супероксидрадикалов у пациентов с острым инфарктом миокарда после успешного тромбозиса [8] подчеркнуло значимость исследования антиоксидантной защиты эндотелиальной поверхности сосудистой стенки [2,9,10]. Для этого перспективно использовать модифицированные формы СОД [11]. Этот фермент связывается с клеточной поверхностью через гликозаминогликаны [12,13]. Последние обладают антиатеросклеротическим действием [14-16], используются в клинической практике [17], атромбогенны [18,19] и являются носителем отрицательного заряда сосудистой стенки [20]. Названные характеристики позволяют рассматривать гликозаминогликаны в качестве перспективного агента для исследования антитромботической защиты сосудистого эндотелия. Совместное действие СОД и гликозаминогликанов может оказаться весьма эффективным не только для лечения тромбозов, но и атеросклероза [2,21]. Таким образом, изучение антитромботической активности комплексов СОД с

хондроитинсульфатом (ХС) предстает актуальным и обоснованным, поскольку этот гликозаминогликан локализован, главным образом, на стенке кровеносных сосудов [22].

Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение антитромботических эффектов комплексов СОД с ХС в ковалентном и нековалентном виде на модели артериального тромбоза у крыс.

**МЕТОДИКА.** Для проведения исследования применяли Cu,Zn-супероксиддисмутазу, выделенную из печени крыс (мол.масса 32 кДа) [23], хондроитинсульфат натрия (хонсурид, хондроитинсульфат А, мол.масса 30 кДа) производства Ленинградского мясокомбината. Нековалентные комплексы СОД с ХС готовили простым смешением названных реагентов в указанных далее соотношениях. Ковалентный конъюгат СОД с ХС приготовили методом бензохинонового связывания этих веществ описанным нами способом [24]. Специфическая активность нативной СОД  $2000 \pm 200$  Ед/мг белка. Остаточная каталитическая активность ковалентного конъюгата СОД-ХС (50% от начального значения активности нативной СОД) составляла  $1000 \pm 200$  Ед/мг белка. Концентрацию белка в препаратах определяли по методу Бредфорд [25]. Содержание белка в нативной и модифицированной ХС СОД составляет 10 и 5%, соответственно. Содержание ХС в конъюгате СОД-ХС около 44%.

Исследование антитромботической активности препаратов СОД проводили на модели артериального тромбоза у крыс. Для изучения были использованы крысы самцы весом 440-460 г (средний вес 450 г). Первоначально крыс интраперитонеально наркотизировали калипсолом (15 мг/кг веса), а затем послойно вскрывали кожу и ткани. После этого отпрепаровывали сонную артерию на 2 см в длину и устанавливали датчик расхода кровотока Statham (диаметром 1 мм), за ним укладывали пленку Parafilm, а в яремную вену устанавливали катетер (для введения препаратов). После периода стабилизации кровотока (в течение 5-10 минут) осуществляли внутривенное болюсное введение через катетер исследуемых препаратов в 0,2 мл физиологического раствора или такой же объем последнего (контроль). Через 10 минут после этого к выделенному и изолированному пленкой Parafilm на протяжении 1 см участку сонной артерии прикладывали на 10 минут промокательную бумагу (размером 5x2 мм), смоченную 50% раствором хлористого железа. В течение часа от установки аппликации хлористого железа на расходомере вели регистрацию кровотока. В ходе эксперимента следили за его изменением (уменьшением или остановкой) и фиксировали время и частоту остановки окклюзии кровотока. По окончании эксперимента из исследуемого участка артерии извлекался тромб и определялась его масса. Схема эксперимента соответствует сообщенной ранее [26]. В каждой экспериментальной группе животных содержалось не менее 4-6 крыс, величина введенных доз указана в тексте.

Статистическую обработку результатов измерений проводили с помощью пакета статистических программ Kwikstat 2.11 [27]. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Исследования антитромботических препаратов ведутся широким фронтом [1-4] с разработкой ряда модельных поражений сосудов животных для оценки антитромботической активности изучаемых средств. На начальном этапе поиска новых препаратов предпочтительнее и экономнее использовать мелких животных. По этим причинам представляется целесообразным применять для изучения модели сосудистого поражения у крыс. Для развития таких поражений артерии животных подвергали обработке электрическим током [28], растворами хлорного [29] и хлористого [29] железа. Две последние модели по биологии сосудистого поражения адекватны защитному действию СОД, так как подразумевают развитие в очаге поражения реакции Хабера - Вейса (по химии Фентона) [30], опосредующей в итоге закупорку кровотока. Защита от подобных нарушений существенно эффективнее при



изначальном присутствии антиоксидантов в зоне поражения [31]. Это диктует необходимость предварительного (предупреждающего поражения) введения исследуемых препаратов в организм. Сравнительное изучение интенсивности тромбообразования у крыс под действием растворов хлористого и хлорного железа показало более высокий уровень при использовании первого [26]. Это определило выбор данной модели [26] для изучения антитромботического действия препаратов СОД и ХС по отдельности или в виде нековалентного или ковалентного комплекса друг с другом.

Обработка артерии крыс раствором хлористого железа индуцирует развитие тромбоза, показателями которого являлись время окклюзирования сосуда (остановка кровотока), частота возникновения таких окклюзий и масса образующегося тромба. Предварительное введение исследуемых препаратов в разной степени предупреждало развитие окклюзии. При сравнении препаратов по дозам ХС оказалось, что наиболее эффективным в предотвращении окклюзии артерии был ковалентный конъюгат СОД-ХС (рис. 1,А). Полное предупреждение окклюзии (со 100% частотой) достоверно достигалось дозой СОД-ХС в 3,8 раза меньшей (по ХС), чем соответствующая доза свободного ХС. По ингибированию роста массы тромба СОД-ХС также оказался

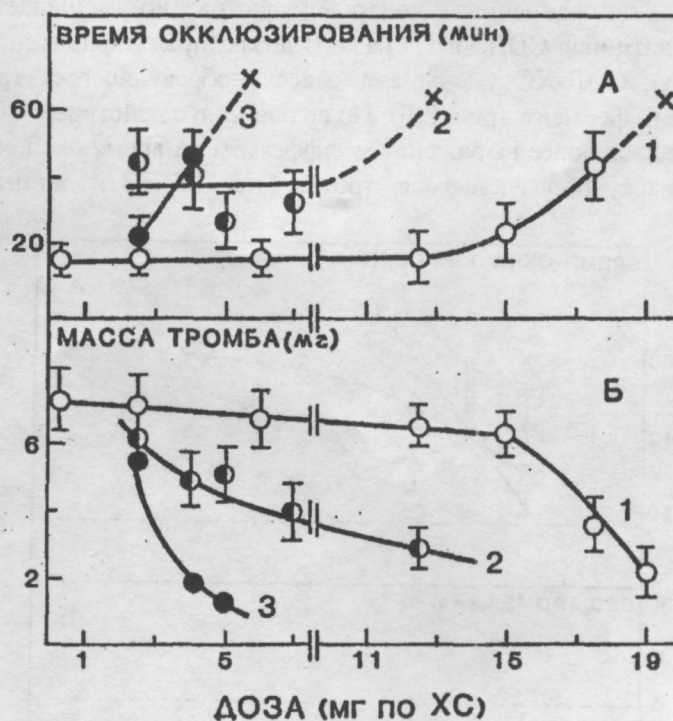


Рисунок 1.

Влияние препаратов ХС и СОД на время окклюзирования артерии (А) и массу образующегося тромба (Б) у крыс при сопоставлении их эффектов по дозам ХС. 1 - свободный ХС, 2 - смесь ХС + СОД, 3 - ковалентный конъюгат СОД-ХС. А: х - отсутствие окклюзии за время наблюдения. На оси ординат указаны показатели контрольного эксперимента.

наиболее действенным средством (рис. 1,Б). Так, в одинаковых дозах по ХС (5 мг) конъюгат СОД-ХС достоверно в 5,9 раза уменьшает массу тромба по сравнению с контролем, тогда как свободный ХС не вызывает достоверно отличного от контроля эффекта. Для достижения нижней границы массы образующегося тромба (1,6-2,1 мг) требуется приблизительно в 5 раз большая доза свободного ХС по сравнению с дозой СОД-ХС (рис. 1,Б). В одинаковых по содержанию компонентов дозах действие СОД-ХС оказалось существенно более эффективным, чем действие их простой смеси / нативной

СОД и свободного ХС (СОД + ХС) / как в отношении предупреждения окклюзии сосуда (рис. 1,А), так и уменьшения массы образующегося тромба (рис. 1,Б). Этот факт указывает на важность ковалентной связи между СОД и ХС для проявления антитромботического эффекта уже при низких дозах конъюгата. Отметим, что в дозах 12 и 19 мг эффективность активированного бензохиноном ХС достоверно не отличается от действия таких же доз свободного ХС. Антитромботическая активность ХС, возможно, обусловлена облегченным взаимодействием тромбина с его ингибиторами на гликозаминогликановой подложке [17,32], ингибированием ГАГ агрегации тромбоцитов [33], ускорением ГАГ активации плазминогена [34]. Однако определяющая роль ковалентного взаимодействия ХС с СОД свидетельствует о важности эффекта СОД в этих условиях.

Экспериментально было продемонстрировано (рис. 2,А), что СОД-ХС является более действенным, чем нативная СОД (в одинаковых по активности фермента дозах), в предупреждении окклюзирования. Для полного предотвращения окклюзии требуется доза СОД-ХС достоверно в два раза меньшая, чем доза нативной СОД. С увеличением дозы СОД-ХС этот конъюгат заметно более эффективно замедляет рост тромба, чем нативная СОД (рис. 2,Б). В одинаковых по активности СОД дозах (0,3 мг активного фермента) СОД-ХС по сравнению с контролем достоверно уменьшает массу тромба в 5,9 раза, тогда как нативная СОД - в 1,5 раза. В дозах, предотвращающих артериальную окклюзию (рис. 2,А), СОД-ХС уменьшает массу образующегося тромба в 2,5 раза больше, чем нативный фермент (рис. 2,Б). По сравнению с действием СОД-ХС нативный биокатализатор обладает более выраженным эффектом на время окклюзирования сосуда (рис. 2,А), чем на массу образующегося тромба (рис. 2,Б). Эти данные подчеркивают

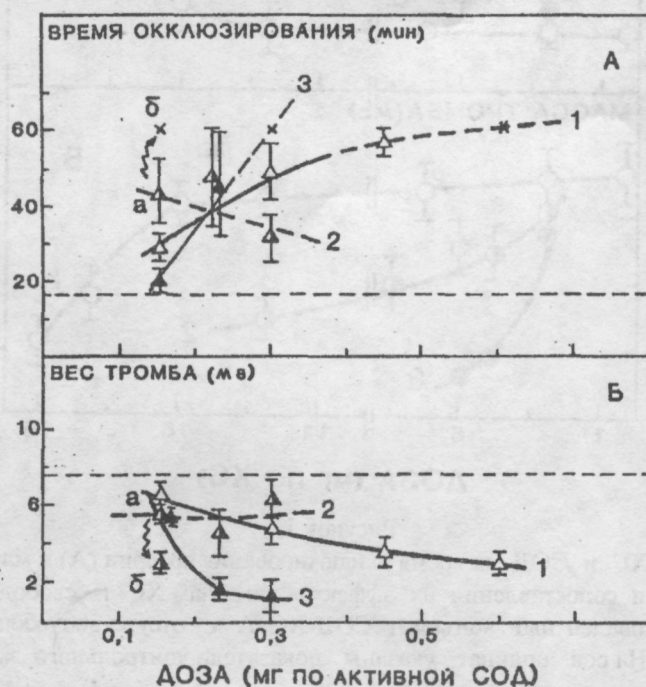


Рисунок 2.

Влияние препаратов СОД и ХС на время развития артериальной окклюзии (А) и массу образующегося тромба (Б) у крыс при сравнении их эффектов по дозам каталитически активной СОД. 1 - нативная СОД, 2 - смесь СОД + ХС, 3 - ковалентный конъюгат СОД-ХС. А: х - отсутствие окклюзии за время наблюдения. Волнистой стрелкой показан переход от состава смеси 0,15 мг СОД + 2,5 мг ХС (а) к составу 0,15 мг СОД + 12,5 мг ХС (б). Значения контрольного эксперимента показаны тонким пунктиром.



вклад ХС в антитромботическое действие конъюгата СОД-ХС. При сравнении действия смеси СОД + ХС с действием конъюгата СОД-ХС в одинаковых по содержанию компонентов дозах (по массе ХС и активности СОД) было найдено (рис. 2, А и Б), что влияние смеси как на время окклюзирования, так и на массу образующегося тромба достоверно не меняется в интервале изученных доз. С ростом дозы СОД-ХС время, необходимое для развития окклюзии, увеличивается (рис. 2, А), а масса тромба уменьшается (рис. 2, Б). Отмеченные различия указывают на значимость ковалентного взаимодействия СОД с ХС для проявления достоверного антитромботического эффекта на данной модели артериального поражения у крыс. Причина невысокой эффективности смеси СОД + ХС может быть обусловлена разрушением в организме нековалентного комплекса, образование которого индуцировано электростатически [24,35]. В результате этого СОД элиминируется из кровотока, не производя заметного антитромботического действия. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт (рис. 2, А и Б), что увеличение в смеси СОД + ХС доли свободного ХС (с состава 0,15 мг активной СОД + 2,5 мг свободного ХС к составу 0,15 мг СОД + 12,5 мг свободного ХС) в 5 раз приводит к заметному увеличению антитромботического эффекта смеси (переход от а к б на рис. 2, показанный волнистой стрелкой). Возможно, укрепление электростатического ХС окружения СОД (при увеличении доли ХС в смеси) увеличивает стабильность такого электростатического комплекса в организме в сравнении с комплексом, имеющим меньшее ХС окружение. Следует подчеркнуть, что при одинаковых по содержанию компонентов дозах СОД-ХС не только со 100% частотой предотвращает окклюзию артерии, но и существенно препятствует росту тромботической массы (рис. 3). Антитромботический эффект СОД связан с торможением развития свободнорадикального поражения клеток при реперфузии окклюзированного сосуда

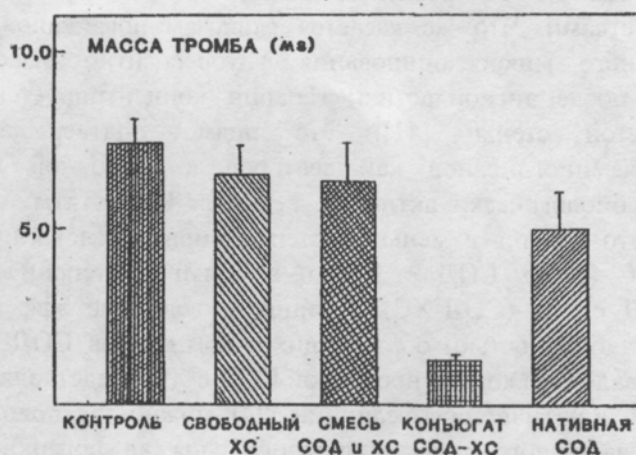


Рисунок 3.

Изменение массы артериального тромба у крыс под действием ковалентного конъюгата СОД-ХС (11,8 мг препарата, содержащего приблизительно 0,6 мг белка СОД и 5 мг ХС) и таких же доз составляющих его компонентов - нативной СОД (0,3 мг активного фермента) и свободного ХС (5 мг) - как и смеси последних (0,3 мг активной СОД + 5 мг свободного ХС). Препараты сравнены в дозах, когда действие СОД-ХС достоверно предотвращает окклюзию артерии крыс.

[30,31]. Сообщалось и о защите эндотелиального фактора релаксации сосудов (EDRF) благодаря действию СОД [36], что, как полагают, замедляет развитие тромбоцит - зависимого тромбоза [5]. В клиническом исследовании обнаружено достоверное усиление продуцирования свободнорадикальных частиц у пациентов с острым инфарктом

миокарда после успешного тромболиза [8]. Этот факт указывает на особую важность регуляции потока активных метаболитов кислорода в подобных ситуациях.

Полагают, что защитный антиоксидантный потенциал экстрацеллюлярного матрикса и клеток сосудистой стенки формируется во многом благодаря концентрированию на ней экстрацеллюлярной СОД [37]. Действительно, было отмечено, что стенка артерий человека содержит большие количества экстрацеллюлярной СОД в отличие от других видов супероксиддисмутаз. Более того, замена в результате мутации в экстрацеллюлярной СОД Arg-213 на Gly (R213G) существенно ухудшает сродство фермента к мутеину к поверхности эндотелия [38]. В результате мутагенеза повышается концентрация СОД в крови. Однако высокий уровень фермента в крови не означает его достаточного содержания на клеточной стенке. Для мутантной формы оно уменьшается в 50 раз по сравнению с диким типом белка. Это ослабляет защиту сосудистой стенки, провоцируя развитие патологии (возможно, почечная недостаточность и др.) [38]. Таким образом, эти факты [37, 38] вместе с известными ранее [11] свидетельствуют о решающей роли адсорбированной на клеточной поверхности сосудистой стенки СОД для предупреждения и уменьшения поражения кровеносных сосудов. С другой стороны, разрушение клеточного гликокаликса под действием активных метаболитов кислорода способствует клеточному поражению [39]. Его размер коррелирует со степенью ингибирования образования свободнорадикальных частиц. На наш взгляд, эти результаты показывают, что при использовании комплексов СОД с ХС их действие проявляется, главным образом, на сосудистой стенке, а наблюдаемый переход *а* к *б* на рис. 2 при увеличении доли ХС лишь подтверждает это. Конечно, прямые доказательства взаимодействия комплексов СОД с ХС с эндотелиальной поверхностью могут быть получены из экспериментов с культурой этих клеток. Однако уже сообщалось, что протеогликаны эндотелия могут связывать тканевой активатор плазминогена на клеточной поверхности без эндоцитоза фермента, создавая его резервуар на клеточной стенке [40]. Это указывает на реальную возможность наружного/поверхностного удержания белков клетками. Что же касается гликозаминогликанов, то с помощью лазерного конфокального микроскопирования флуоресцентно было показано, что локально введенный после ангиопластики гепарин концентрируется на внутренней поверхности сосудистой стенки [41]. Это прямо подтверждает возможность использования гликозаминогликанов как векторов к клеточной поверхности для закоривания на ней биологически активных веществ. Результаты настоящей работы демонстрируют, что это удастся в меньшей степени при образовании нековалентного комплекса СОД с ХС (смесь СОД + ХС) и в большей степени при ковалентном конъюгировании СОД с ХС (СОД-ХС). Разница в величине эффектов обусловлена разной прочностью (стабильностью) образующихся комплексов СОД с ХС. Учитывая, что основная масса ковалентно конъюгированной СОД с ХС представляет собой димер из модифицированной ХС и нативной субъединицы [24], можно предположить образование самообновляющегося защитного антиоксидантного слоя на поверхности клеток. ХС заякоривается на гликокаликсе клеточной мембраны и удерживает на ней димерную молекулу СОД. Последняя при разных воздействиях может диссоциировать, оставляя связанной с поверхностью лишь одну ковалентно конъюгированную с ХС субъединицу. С ней, вероятно, может связываться субъединица эндогенной СОД организма, продуцируемой в разных условиях. В результате этого поддерживается длительная эффективная антиоксидантная защита сосудистой стенки. Подобное взаимодействие *in vitro* уже давно отмечалось для модифицированных субъединичных ферментов [42,43]. Возможно, такая схема объясняет продолжительный эффект малых доз СОД-ХС, в наших экспериментах. Для выяснения точного механизма взаимодействия требуется проведение исследования свойств СОД-ХС *in vitro* с культурами клеток и *in vivo* с большим количеством животных.



Помимо этого, дальнейшее изучение конъюгата СОД-ХС перспективно и с других точек зрения. Участие свободнорадикальных процессов в тромбообразовании [7] указывает значимость препаратов СОД как смежного агента при терапии тромбозов [44,45]. Разработка таких средств составляет новый этап в изучении тромболизиса [11]. Вместе с тем, согласно современных представлений молекулярной медицины, тромбоз рассматривается также как ключевой фактор позднего атеросклероза, способствуя превращению хронических процессов в острые [21]. Имеются сведения и об участии системы коагуляции и фибринолиза в развитии атеросклероза [46,47]. Для устранения возникающих при этом нарушений предлагаются методы антитромботического вмешательства [1]. Рекомендуемая стратегия лечения опирается, в том числе, на необходимость защиты эндотелия от радикальных поражений сосудистой стенки [2]. Для реализации этого подхода весьма полезными могут оказаться антитромботические свойства конъюгата СОД-ХС. Перспективность изучения этого конъюгата для предупреждения и лечения атеросклероза и его осложнений подчеркивается антиатерогенными свойствами гликозаминогликанов [2,14-16,21]. И хотя последовательное структурно - функциональное изучение последних находится в начальной фазе [48], в целом, упомянутые биохимические, фармакологические, биомедицинские данные позволяют надеяться на успешное продолжение развития рассмотренного научно - практического направления.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику Е.И. Чазову, чл. - корр. РАН В.Н. Смирнову, профессору В.В. Кухарчуку за внимание и поддержку этого исследования. Признательны за помощь в экспериментальной работе сотрудникам Кардиоцентра О.В. Кузьминой, Е.Б. Жариковой, И.А. Собенину и Т.П. Собесской.

Настоящая работа частично финансировалась из средств Государственной научно - технической программы "Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении" по направлению "Атеросклероз" (грант 009 и 508) и Министерством Здравоохранения и Медицинской Промышленности Российской Федерации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Topol E. (1995) Am. J. Cardiol., 75, 27B-33B.
2. Rubanyi G.M. J. (1993) Cardiovasc. Pharm., 22, Suppl.4, S1-S14.
3. Becker R.C. (1993), Cardiovasc. Drugs Ther. 7, 825-828.
4. Folts J.D. (1995) Cardiovasc. Drugs Ther., 9, 31-43.
5. Mehta J.L., Nichols W.W., Saldeen T.G.P., Chandna V.K., Nicolini F.A., Lowson D.L., ter Riet M.F. (1990), J. Cardiovasc. Pharmacol. 16, 112-120.
6. Berger H. C., Frangakis C. J. Jr. (1987). Neue Pharmazeutische Anwendung. DE 3715662 A 1,
7. Kumanri R., Dikshit M., Srimal R.C. (1993), Thrombos. Res. 69, 101-111.
8. Young I.S., Purvis J.A., Lightbody J.H., Adgey A.A., Trimble E.R. (1993), Eur. Heart J. 14, 1027-1033.
9. Yu B.P. (1994), Physiol. Rev. 74, 139-162.
10. Sies H. (1993), Eur. J. Biochem. 215, 213-219.
11. Максименко А.В. (1993), Усп. соврем. биологии, 113, 351-365.
12. Inoue M., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Hatanaka H., Adachi T. (1991) J.Biol.Chem. , 266, 16409-16414.

13. Karlsson K., Sandstrom J., Edland A., Marklund S.L. (1994) *Lab. Invest.*, **70**, 705-710.
14. Morrison L.M., Schjeide O.A. (1974). *Coronary Heart Disease and the Mucopolysaccharides (Glycosaminoglycans)*. Charles C. Thomas. Springfield. IL.
15. Matsushima T., Nakashima Y., Sugano M., Tasaki H., Kuroiwa A., Koide O. (1987), *Artery*, **14**, 316-337.
16. Ross R. (1993) *Nature*, **362**, 801-809.
17. Bianchini P. (1989), *Semin. in Thrombos. Hemostas.* **15**, 365-369.
18. Heyderman R.S., Klein N.J., Shennan G.I., Levin M. (1992) *Thrombos. Res.*, **87**, 677-685.
19. Bourin M.-C., Lindahl U. (1993), *Biochem. J.* **289**, 313-330.
20. Danon D., Skutelsky E. (1976), *Ann. N. Y. Acad.Sci.* **275**, 47-63.
21. Badimon J.J. Fuster V., Chesebro J.H., Badimon L. (1993), *Circulation*, **87**, Suppl. II, II-3 - II-16.
22. Lark M.W., Yeo T.-K., Mar H., Lara S., Hellstrom I., Hellstrom K.-E., Wight T.N. (1988) *J. Histochem.Cytochem.*, **36**, 1211-1221.
23. Симолян М.А. (1984) *Биохимия.*, **49**, 1792-1798.
24. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. (1997) *Биохимия.*, **62**, 1359-1363.
25. Bradford M.M. (1976) *Anal.Biochem.*, **72**, 248-254.
26. Schumacher W.A., Heran C.L., Steinbacher T.E., Youssef S., Ogletree M.L. (1993), *J. Cardiovasc. Pharm.* **22**, 526-533.
27. Elliott A.E., (1990) *Statistical Data Analysis for IBM PC and Compatible Computers*. Texassoft Mission Technologies. Cedar Hill. Texas.
28. Schumacher W.A., Heran C.H., Steinbacher T.E., Megill J.R., Bird J.E., Giancarli M.R., Durham S.K. (1992) *Trombos. Res.*, **68**, 157-166.
29. Broersma R.J., Kutcher L.W., Heminger E.F. (1991) *Trombos. Res.*, **64**, 405-412.
30. Halliwell B. (1994) *Lancet.*, **344**, 721-724.
31. Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1990), *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 223-226.
32. Gebbink R.K., Reynolds C.H., Tollefsen D.M., Mertens K., Pannekoek H. (1993), *Biochemistry*, **32**, 1675-1680.
33. Fernandez F., Nguyen P., Van Ryn J., Ofosu F.A., Hirsch J., Buchanan M.R. (1986) *Thrombos. Res.*, **43**, 491-495.
34. Edelberg J.M., Pizzo S.V. (1991), *Biochem. J.* **276**, 785-791.
35. Максименко А.В., Терентьева Е.Л., Коновалова О.Ю., Торчилин В.П. (1988) *Укр.биохим. журн.*, **60**, 20-25.
36. Meng Y.Y., Trachtenburg J., Ryan U.S., Abendschein D.R. (1995) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **25**, 269-275.
37. Stralin P., Karlsson K., Johansson B.O., Marklund S.L. (1995), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 2032-2036.
38. Adachi T., Yamada Y., Morihara N., Yamazaki N., Murukami T., Futenma A., Kato K., Hirano K. (1996) *Biochem. J.*, **313**, 235-239.
39. Czarnowska E., Karwatowska-Prokopczuk E. (1995), *Basic.Res.Cardiol.* **90**, 357-364.
40. Bohm T., Geiger M., Binder B.R. (1996) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, **16**, 665-672.
41. Tomaru T., Fujimori Y., Morita T., Sakamoto Y., Nakamura F., Omata M., Uchida Y. (1996) *Jpn.Circ.J.*, **60**, 981-992.
42. Иммуобилизованные ферменты (1976), ( под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинска ). М.: МГУ. с. 224-228.



43. Муронец В.Н., Наградова Н.К. (1984) Имобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука., 208 с.
44. Ambrosio G., Weisfeldt M.L., Jacobus W.E., Flaherty J.T. (1987), *Circulation*. **75**, 282-291.
45. Chen L.Y., Nichols W.W., Hendricks J., Mehta J.L. (1995), *Amer. Heart J.* **129**, 211-218.
46. Tanaka K., Senishi K. (1993), *Lab. Invest.* **69**, 5-18.
47. Falk E., Fernandez-Ortiz A. (1995) *Am. J. Cardiol.*, **75**, 5B-11B.
48. David G., Danneels A., Duerr J., Grootjans J., Mertens G., Nackaerts K., Romaris M., Schrurs B., Steinfeld R., Vekemans S. (1995) *Atherosclerosis*, **118**, Suppl., S57-S67.

#### ANTITHROMBOTIC ACTIVITY OF COMPLEXES BETWEEN SUPEROXIDE DISMUTASE AND CHONDROITIN SULFATE AT THE ARTERIAL INJURY IN RATS

A. V. MAKSIMENKO, E. G. TISCHENKO, V. L. GOLUBYKH

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research Centre, 3-rd Cherepkovskaya Street  
15 A, 121552 Moscow, Russia.

The comparative antithrombotic activity of superoxide dismutase and chondroitin sulfate in the form of covalent or noncovalent complexes was studied on the rat arterial thrombosis induced by treatment of vessel with ferrous chloride solution. The covalent conjugate between superoxide dismutase and chondroitin sulfate has been shown to exert the highest antithrombotic effect. The higher antithrombotic activity of covalent conjugate is stipulated by its coupling on the glycocalyx of vascular wall and by the stability of the covalent bond between superoxide dismutase subunits and chondroitin sulfate.

**Key Words:** superoxide dismutase, antioxidants, chondroitin sulfate, glycosaminoglycans, glucocalyx, injury of vessel wall.