

## АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КАТАЛАЗЫ И ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА ПРИ АРТЕРИАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ У КРЫС

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

Институт экспериментальной кардиологии Российского Кардиологического Научно -  
Производственного Комплекса МЗМП РФ, 121552 Москва, 3-я Черепковская улица 15 А,  
факс: (095) 415-2925

Антитромботическая активность препаратов каталазы и хондроитинсульфата исследована на модели артериального тромбоза у крыс, индуцированного обработкой сосуда раствором хлористого железа. В одинаковых по содержанию активной каталазы дозах сравнивалось действие нативной и ковалентно модифицированной хондроитинсульфатом каталазы, а также смеси нативной каталазы и свободного хондроитинсульфата, взятых в соответствующем содержанию в ковалентном конъюгате соотношении. Было показано, что антитромботическое действие конъюгата и смеси его компонентов довольно близко друг другу и достоверно превосходит эффект нативного фермента. Конъюгат оказался наиболее эффективным производным в отношении замедления/предотвращения окклюзии артерии. Действие препаратов каталазы влияет на структуру образующегося тромба, способствуя длительному поддержанию кровотока при использовании в малых дозах. Обоснованы направления дальнейших исследований антитромботической активности производных каталазы, супероксиддисмутазы и хондроитинсульфата.

**Ключевые слова:** каталаза, антиоксиданты, хондроитинсульфат, гликозаминогликаны, агрегация тромбоцитов, поражение сосудистой стенки.

**ВВЕДЕНИЕ.** Для защиты организма от поражающего действия реакционноспособных частиц кислорода служат антиоксидантные ферменты - супероксиддисмутаза, каталаза, некоторые пероксидазы. Терапевтическая приложимость действия этих биокатализаторов в наибольшей степени изучена для супероксиддисмутазы. Сравнительно недавно стали появляться сообщения о значимости защитного действия каталазы (КАТ), детоксифицирующей накопления перекиси водорода [1,2]. Эти публикации убедительно меняли точку зрения о КАТ как о незначительном для удаления перекиси водорода ферменте, поскольку эту роль отводили глутатионпероксидазе (см. литературу к [1,2]). Важность защитного действия КАТ подчеркивалась при развитии реперфузионного [3] и атеросклеротического [4] поражения. Вредное действие перекиси водорода на слизистые клетки желудка крыс было пропорционально величине ингибирования внутриклеточной супероксиддисмутазы [5]. Защитный эффект эндогенной КАТ при этом невелик [6]. Возможно, он был бы существенно выше при локализации КАТ на внешней поверхности клеточной мембраны [7]. Такому расположению КАТ способствует модификация фермента, повышающая его концентрирование на клеточной поверхности [8]. В качестве заякоряющего фермент-агента перспективно использование компонентов клеточного гликокаликса, тем более что

они обладают собственными антитромботическим и антиатеросклеротическим эффектами [8,9].

Химическая модификация КАТ по ее поверхностным аминок группам не приводит к существенному падению каталитической активности фермента и способствует увеличенному проявлению его защитного действия при экспериментальной терапии [7,10]. Мы использовали эти поверхностные аминок группы КАТ для ее конъюгирования с таким гликозаминогликаном как хондроитинсульфат натрия. Свойства полученной модифицированной КАТ позволяли использовать ее для биомедицинского изучения [11]. Оно было выполнено на модели артериального поражения у крыс, индуцированного обработкой сосуда раствором хлористого железа [8]. Проведение подобных исследований с препаратами супероксиддисмутазы (СОД) показало перспективность такого подхода [8,12] для разработки новых антитромботических препаратов.

Целью нашего исследования являлась оценка сравнительной антитромботической активности препаратов КАТ при артериальном поражении у крыс.

**МЕТОДИКА.** В работе были использованы препараты КАТ, из печени быка, и хондроитин-4-сульфат А с молекулярной массой 150 кДа из сухожилий кита, а также бензохинон и диметилформамид, полученные от фирмы "Sigma", (США). Перекись водорода - производства "Merck", (Германия), остальные реагенты - аналитически чистые вещества отечественного производства.

Нековалентные комплексы КАТ с хондроитинсульфатом (ХС) готовили простым смешением (КАТ + ХС) этих реагентов в указанных далее соотношениях. Ковалентный конъюгат КАТ с ХС (КАТ-ХС) получали методом бензохиноновой активации ХС с последующим связыванием его с КАТ по ранее описанному нами способу [11]. Содержание белка в препаратах определялось по методу Бредфорда [13]. Ферментативную активность КАТ определяли спектрофотометрически по исчезновению перекиси водорода при комнатной температуре и рН 7,0 на 240 нм [14]. Специфическая активность нативной КАТ (11000 Ед/мг белка) обеспечивает остаточную каталазную активность полученного конъюгата в 33-34% от первоначальной. Содержание белка в препарате КАТ-ХС 6%, хондроитинсульфата 33% по весу.

Для биомедицинского изучения использовали крыс самцов весом 400-550 г (средний вес 420 г). После наркотизирования животных калипсолом проводили операцию по отпрепарированию сонной артерии и установке датчиков и внутривенного катетера. Тромботическое поражение артерии крысы вызывали обработкой изолированного участка сосуда 50% раствором хлористого железа, как это подробно описано ранее [8]. Кратко схему эксперимента можно представить следующим образом. После внутривенного болюсного введения через катетер 0,2 мл исследуемых препаратов или физиологического раствора (контроль) через 10 минут на выделенном сегменте сонной артерии крысы проводили 10 минутную аппликацию хлористого железа. В течение часа от момента аппликации следили за величиной кровотока на расходомере, отмечая время и частоту окклюзирования артерии. По окончании эксперимента из исследуемого фрагмента артерии крысы извлекали тромб и определяли его массу. Каждая экспериментальная группа животных состояла из не менее чем 4-6 крыс. Величины введенных доз указаны в тексте. Иллюстративно схема эксперимента представлена на рис. 1.

Статистическую обработку полученных результатов биомедицинского изучения проводили с помощью пакета статистических программ Kwikstat 2,11 [15]. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Несбалансированное присутствие в организме  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  системы способствует генерированию свободнорадикальных частиц кислорода [16], обладающих заметным деструктивным потенциалом [3,4,9].

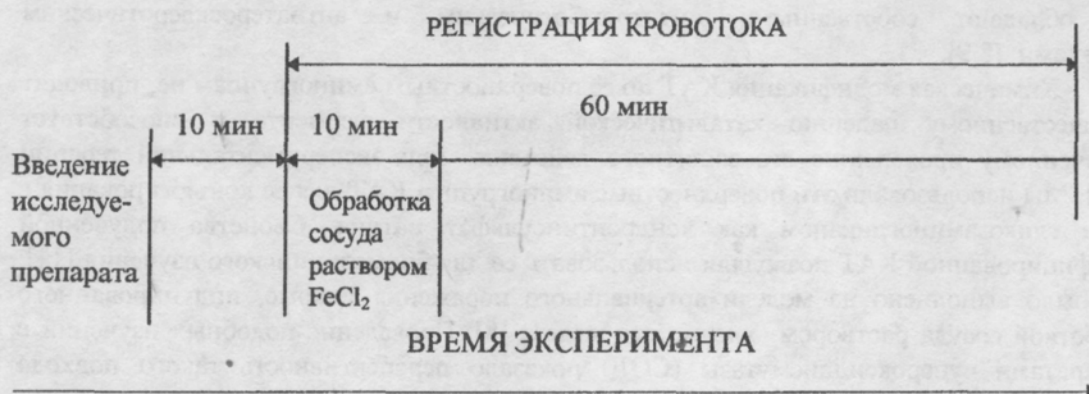


Рисунок 1.  
Схематическое представление эксперимента *in vivo*

Защитное действие СОД против возникающих при этом супероксидрадикалов приводит к образованию перекиси водорода. Последняя может ускорять активацию тромбоцитов (см. литературу к [3]), провоцируя тромбообразование. Токсичное действие на клетки перекиси водорода [5,16] устраняется ее разложением [16]. В качестве агента подобного действия можно использовать КАТ [3,16], ферментативно превращающую перекись водорода в воду и молекулярный кислород. При этом важно изначальное присутствие КАТ в очаге поражения, что обуславливает предупреждающую форму ее введения на данной модели тромбоза [8]. Приведенную выше сильно упрощенную схему взаимодействий можно считать удовлетворительно соответствующей исследуемой нами ситуации артериального поражения у крыс, индуцированного обработкой сосуда раствором хлористого железа при предварительном введении в организм препаратов КАТ. Таким образом, экзогенные препараты КАТ, устраняя образующуюся при наблюдаемом нарушении перекись водорода, могут снижать/предупреждать величину сосудистого поражения. Это проявляется как в предотвращении окклюзии артерии, так и в уменьшении массы образующегося тромба благодаря ингибированию агрегации тромбоцитов в зоне поражения. Имеются и другие более медленные антитромботические механизмы, опосредованные действием КАТ [4,16]. В нашем случае, лимитирующим, по-видимому, оказывается воздействие на агрегацию тромбоцитов, быстро и чувствительно регистрируемое на модели артериального тромбоза у крыс.

Экспериментальное изучение показало (рис. 2), что с увеличением дозы препаратов КАТ усиливается их антитромботическое действие. При этом конъюгат КАТ-ХС и смесь КАТ + ХС достоверно уменьшают массу образующегося тромба в дозах приблизительно на порядок меньше, чем нативная КАТ (рис. 2,А). По этому показателю активность конъюгата КАТ-ХС достоверно не отличается от эффекта смеси его активных компонентов КАТ + ХС, взятых в соответствующем содержании конъюгата соотношении. Вместе с тем, влияние конъюгата КАТ-ХС на время окклюзии артерии достоверно превосходит действие смеси КАТ + ХС и нативного фермента (рис. 2,Б). Ковалентный конъюгат КАТ-ХС оказывается по сравнению с последними наиболее эффективным в замедлении / предупреждении полной закупорки сосуда. Отметим, что свободный ХС в дозе до 12,5 мг не оказывает достоверно отличающегося от контрольного показателя антитромботического действия [8]. Мы использовали в этом эксперименте существенно меньшие дозы, наибольшая из которых составила 2,5 мг свободного ХС. Поэтому целесообразнее выглядит сравнение эффективности доз препаратов по величине ферментативной активности КАТ. На рис. 3. представлено такое сопоставление. Величины доз препаратов КАТ, обеспечивающие предотвращение окклюзии, приведены на диаграмме рис. 3,А. При действии этих доз наблюдается иллюстративно показанное

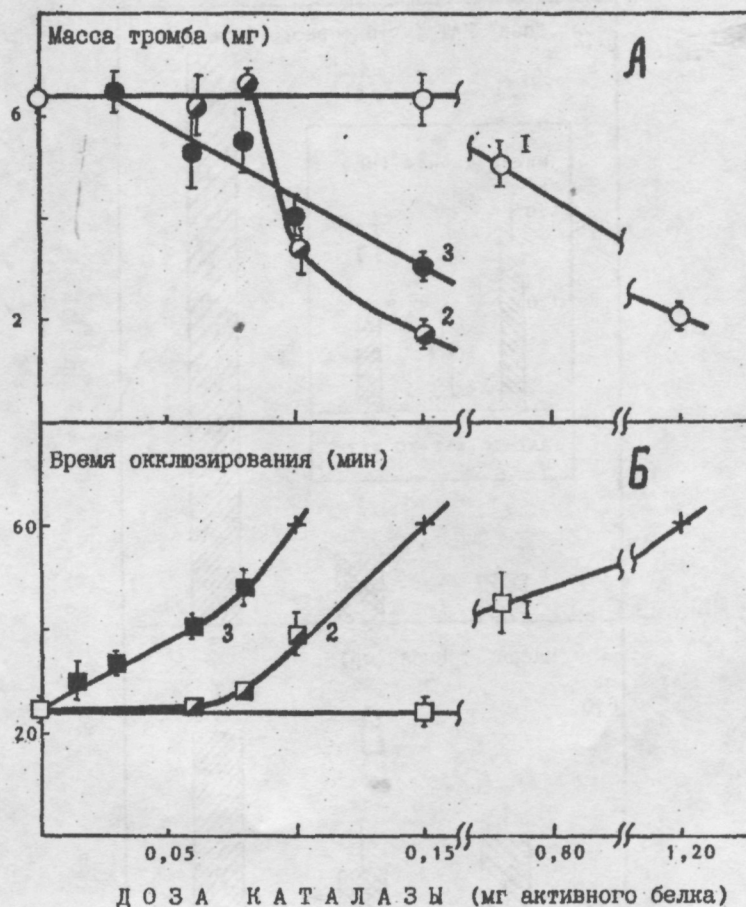


Рисунок 2.

Влияние препаратов КАТ на массу образующегося тромба (А) и время окклюзии артерии крыс (Б) при сопоставлении по дозам активного фермента. 1 - нативная КАТ, 2 - смесь КАТ + ХС, 3 - конъюгат КАТ-ХС. На оси ординат указаны показатели контрольного эксперимента. Б: + - отсутствие окклюзии за время наблюдения.

на врезке (рис. 3,Б) образование отмеченных тромботических масс. По сравнению с другими препаратами конъюгат КАТ-ХС эффективнее замедляет наступление окклюзии артерии (рис. 2,Б), чем уменьшает рост массы тромба (рис. 2,А и 3,Б). Действительно, сравнение масс образующихся тромбов при действии доз препаратов, соответствующих предупреждающей окклюзию дозе КАТ-ХС, демонстрирует (рис. 3,В), что эффекты КАТ-ХС и КАТ + ХС, как и показатели нативной КАТ и контрольного эксперимента (не показан) достоверно не отличаются, соответственно, между собой. В целом, антитромботическое действие конъюгата КАТ-ХС и смеси КАТ + ХС довольно близко друг другу и заметно превосходит эффект нативного фермента и свободного ХС.

Значительный антитромботический эффект совместного применения КАТ с ХС, как в форме ковалентного конъюгата КАТ-ХС, так и в виде простой смеси КАТ + ХС, (рис. 2 и 3) подчеркивает значимость активности каждого из компонентов. Действие препаратов КАТ, как уже отмечалось выше, связано в данной модели сосудистого поражения с ингибированием агрегации тромбоцитов. Устраняя перекись водорода, КАТ, с одной стороны, повышает необходимую величину эффективной концентрации индуктора агрегации тромбоцитов. Последнее определяется тем, что в присутствии перекиси водорода величина названных концентраций снижается [17]. С другой стороны, действие КАТ уменьшает поток свободнорадикальных частиц кислорода,

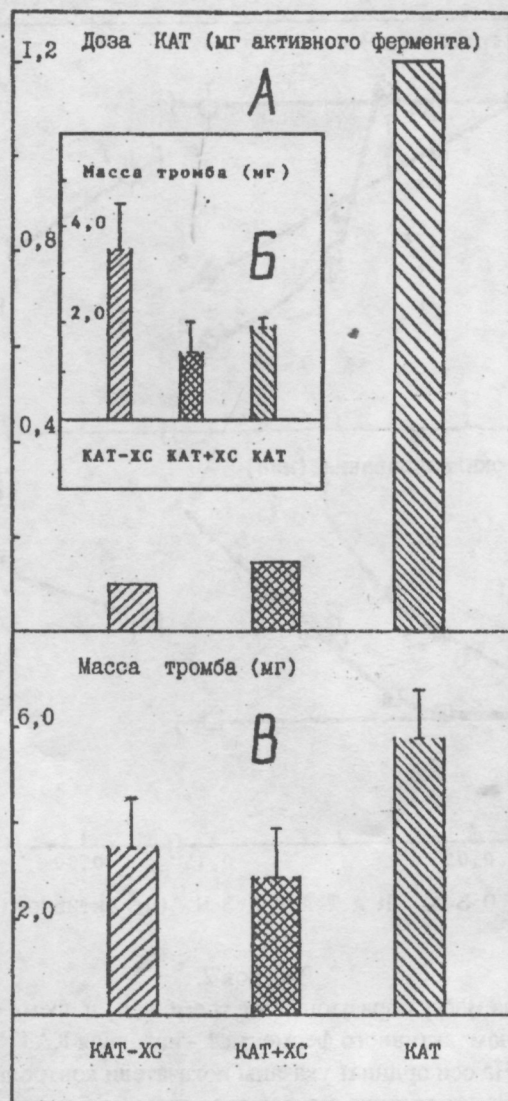


Рисунок 3.

Диаграммное сравнение антитромботического эффекта препаратов КАТ при артериальном поражении у крыс. А: сравнение величин доз препаратов (слева направо) КАТ-ХС, КАТ + ХС и нативная КАТ (по активной КАТ,) при которых достигается полное предотвращение окклюзии; Б: сравнение масс образующихся тромбов при действии доз препаратов, предотвращающих артериальную окклюзию; В: сравнение масс образующихся тромбов при дозах препаратов одинаковых по активной КАТ с дозой КАТ-ХС, предотвращающей окклюзию. Так, 5,5 мг конъюгата КАТ-ХС содержат 0,33 мг белка КАТ (0,1 мг активной КАТ) и 1,82 мг ХС: действие этой дозы конъюгата сравнивалось с действием 0,1 мг активной нативной КАТ или смеси 0,1 мг активной нативной КАТ и 1,82 мг свободного ХС.

способствующих усилению спонтанной активации тромбоцитов [18], повышающих риск тромбообразования [3]. Хондроитин - 4 - сульфат протеогликан представлен на поверхности мембраны тромбоцитов и может играть рецепторную роль при индуцированной поликатионами агрегации тромбоцитов [19]. Понятно, что присутствие экзогенного ХС будет уменьшать число индуцирующих взаимодействий и тем самым снижать агрегацию тромбоцитов. Выяснение закономерностей влияния препаратов КАТ и ХС на агрегацию тромбоцитов, конечно, требует отдельного изучения.

Ранее отмечалось, что гепарансульфат протеогликан достоверно сокращает неоинтимальное утолщение в зоне поражения артериального эндотелия кроликов [9]. При этом для наблюдаемого эффекта значимо действие белковой и гликозаминогликановой компоненты этого соединения. Подобное белок - гликозаминогликановое производное образуется и в нашем случае при применении конъюгата КАТ-ХС или смеси КАТ + ХС. Вероятно, больший размер взаимодействующих компонентов (КАТ и ХС), чем в случае СОД [8,12], обуславливает большую стабильность их нековалентного комплекса, проявляющего заметное антитромботическое действие (рис. 3). Действительно, повышение последнего для смеси СОД с ХС наблюдалось при существенном увеличении (в 5 раз) доли ХС в смеси [8]. По видимому, значимость ковалентной модификации КАТ хондроитинсульфатом сказывается при использовании низких доз конъюгата КАТ-ХС по отношению к замедлению окклюзии артерии крысы (рис. 2,Б). Для этого оказывается достаточной достигнутая степень ковалентной модификации КАТ [11]. Отмеченное замедление окклюзии подчеркивает логичность усиления антитромботического действия малых доз производных КАТ сочетанным использованием с производными СОД, существенно уменьшающими рост массы образующегося тромба [8].

Комбинированное применение КАТ и СОД (в виде конъюгата [11] или смеси производных) может позволить обнаружить высокоэффективный и безопасный антитромботический препарат [20,21], активность которого локализуется, на сосудистой стенке [8]. Безопасность действия такого препарата следует отметить особо. Производные КАТ с ХС в определенном интервале доз (рис. 2) допускают образование близких к контрольному показателю тромботических масс, достоверно замедляя, однако, наступление окклюзии. Это свидетельствует о существенном влиянии исследуемых производных на структуру тромба. Его масса растет, но при этом сохраняется кровоток, что указывает на рыхлость/проницаемость тромботического образования. С одной стороны, такой эффект способствует поддержанию (в определенной степени) кровотока. С другой стороны, рыхлость тромботической массы опасна возможной эмболизацией. Действительно, при использовании нативной КАТ (доза 0,78 мг, рис. 2) наблюдались резкие колебания кровотока, связанные с отрывом тромба и его последующем быстрым нарастании. Для повышения безопасности действия производных КАТ целесообразно их применение вместе с производными СОД, когда они сопряженно превращают активные метаболиты кислорода в безопасные воду и молекулярный кислород при использовании невысоких доз препаратов. Апробация такого подхода, связанная с выполнением ряда отдельных исследований, составляет предмет нашего последующего изучения.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику Е.И. Чазову, чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову, профессору Кухарчуку за внимание и поддержку этого исследования. Авторы признательны за помощь в экспериментальной работе сотрудникам Кардиоцентра О.С. Козыревой, 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" (гранты 009 и 508) и Министерством Здравоохранения и Медицинской Промышленности Российской Федерации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Izawa S., Inoue Y., Kimura A. (1996) *Biochem.J.*, 320, 61-67.
2. Gaetani G.F., Ferraris A.M., Rolfo M., Mangerini., Arena S., Kirkman H.N. (1996), *Blood*, 87, 1595-1599.
3. Forde R.C., Fitzgerald D.J. (1997) *Circulation*, 95, 787-789.

4. Welch G.N., Upchurch G., Jr., Loscalzo J. (1997), *Ann.N.Y. Acad.Sci.* **811**, 48-58.
5. Hiraishi H., Terano A., Sugimoto T., Harada T., Razandi M., Ivey K.J. (1994), *J.Clin. Invest.* **93**, 331-338.
6. Hiraishi H., Terano A., Ota S., Mutoh H., Sugimoto T., Razandi M., Ivey K.J. (1991) *Am. J. Physiol.*, **261**, G921-G928.
7. Максименко А.В. (1993) *Усп.соврем.биологии.*, **113**, 351-365.
8. Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Голубых В.Л. (1998) *Вопр.мед.химии*, **44**
9. Bingley J.A., Campbell J.H., Hayward I.P., Campbell G.R. (1997) *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, **811**, 238-242.
10. Максименко А.В., Безрукавникова Л.М., Григорьева Е.Л., Тищенко Е.Г., Архипова О.Г., Яглов В.В., Торчилин В.П. (1992), *Вопр.мед.химии*. **38** (3), 4-8.
11. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. (1997), *Биохимия*, **62**, 1364-1368.
12. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. (1997), *Биохимия*, **62**, 1359-1363.
13. Bradford M.M. (1976), *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
14. Maksimenko A.V., Bezrukavnikova L.M., Grigorieva E.L., Yaglov V.V., Torchilin V.P. (1992), *Ann.N.Y. Acad.Sci.* **672**, 118-125.
15. Elliott A.E. (1990) *Statistical Data Analysis for IBM PC and Compatible computers*. Texasoft Mission Technologies. Cedar. Hill. Houston, Texas.
16. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) *Arch.Biochem.Biophys.*, **246**, 501-514.
17. Pratico D., Iuliano L., Pulcinelli F.M., Bonavita M.S., Gazzaniga P.P., Violi F. (1992), *J. Lab.Clin.Med.* **119**, 346-370.
18. Leo R., Pratico D., Iuliano L., Pulcinelli F.M., Ghiselli A., Pignatelli P., Colavita A. R., Fitz Gerald G.A., Violi F. (1997), *Circulation* **95**, 885-891.
19. Donato J.L. Marcondes S., Antunes E., Nogueira M.D., Nader H.B., Dietrich C.P., Rendu F., de Nucci G. (1996), *Br.J. Pharmacol.* **119**, 1447-1453.
20. Mao G.D., Thomas P.D., Lopaschuk G.D., Poznansky M.J. (1993), *J.Biol.Chem.* **268**, 416-420.
21. Jeroudi M.O., Harrtley C.J., Bolli R. (1994), *Am.J.Cardiol.* **73**, 2B-7B.

#### ANTITHROMBOTIC ACTION OF CATALASE AND CHONDROITIN SULFATE DERIVATIVES AT THE ARTERIAL INJURY IN RATS

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

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

The antithrombotic action of catalase and chondroitin sulfate derivatives was studied on the rat arterial thrombosis induced by treatment of vessel with ferrous chloride solution. The effect of native or chondroitin sulfate modified catalase, as well as the mixture of native catalase and free chondroitin sulfate in ratio which is equal to their content in conjugate was compared in respect to corresponding doses according to active catalase content. The antithrombotic action of conjugate and its component mixture is rather similar with each other and significantly exceeds the effect of native enzyme. The conjugate was the most effective in respect to retarding / prevention of arterial occlusion. The action of catalase preparations was altered the thrombus structure conducting blood stream retention at the low doses used. The directions of further studies of antithrombotic activity for catalase, superoxide dismutase and chondroitin sulfate derivatives were founded.

**Key words:** catalase, antioxidants, chondroitin sulfate, glycosaminoglycans, platelet aggregation, injury of vessel wall.