

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИАГРЕГАЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ КОВАЛЕНТНОГО БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА СУПЕРОКСИДИСМУТАЗА-ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-КАТАЛАЗА НА ТРОМБОЦИТЫ

*А.В. Ваваев, Л.И. Бурячковская, Е.Г. Тищенко, И.А. Учитель, А.В. Максименко**

Институт экспериментальной кардиологии, Российский Кардиологический
Научно-Производственный Комплекс Росмедтехнологий, 121552 Москва,
3-я Черепковская ул., дом 15А; тел.: (495) 414-67-30, 414-60-25;
факс: (495) 414-66-99; эл. почта: alexmak@cardio.ru

Ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза (СОД-ХС-КАТ) оказывал дозозависимое ингибирующее действие на индуцированную агрегацию тромбоцитов в присутствии перекиси водорода. Антиоксидантная активность СОД-ХС-КАТ проявлялась в дозах, существенно меньших, чем для других производных КАТ. Конъюгат СОД-ХС-КАТ ингибировал индуцированную агрегацию тромбоцитов независимо от вида индукторов, а также предотвращал распластывание тромбоцитов на стекле, что свидетельствовало о его влиянии на адгезивные свойства тромбоцитов. Обнаруженные эффекты конъюгата СОД-ХС-КАТ подчеркивают перспективность его биофармацевтического применения в качестве средства антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация, ADP, перекись водорода, каталаза, биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза

ВВЕДЕНИЕ. Оксидативный стресс сопровождает целый ряд сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. Клинически обнаружена достоверная связь между заболеваниями коронарных сосудов и снижением уровня высвобождаемой гепарином в кровоток внеклеточной супероксиддисмутазы (СОД, при измерении её содержания в крови разных групп пациентов), что подчеркивает значимость защитного действия антиоксидантных ферментов [3, 4]. Действительно, в исследованиях *in vivo* был показан защитный эффект внеклеточной СОД против развития атеросклероза, гипертонии, сердечной недостаточности, сахарного диабета [5-10]. Заметен растущий интерес к использованию различных изоферментов СОД, каталазы (КАТ), приемов экспериментальной генной терапии, комбинированного применения СОД и КАТ для обоснования и развития антиоксидантной терапии [11]. В экспериментальных исследованиях высокоэффективным агентом антитромботического действия зарекомендовал себя полученный нами ковалентный биферментный конъюгат СОД-хондроитинсульфат (ХС)-КАТ [6]. Достоверное увеличение времени наступления окклюзии (на модели артериального тромбоза у крыс, индуцированного обработкой сосуда насыщенным раствором хлористого железа) при сравнительном исследовании производных КАТ продемонстрировало высокий антитромботический потенциал модифицированных форм КАТ [12]. Целью настоящей работы стало изучение влияния на тромбоциты конъюгата СОД-ХС-КАТ в присутствии активных форм кислорода, в качестве которых использовалась одна из наиболее стабильных из них – перекись водорода.

* - адресат для переписки

ДЕЙСТВИЕ БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА НА ТРОМБОЦИТЫ

МЕТОДИКА. В работе были использованы препараты КАТ из печени быка со специфической (удельной) активностью 11000 Ед/мг белка; хондроитин-4-сульфат А с молекулярной массой 25-30 кДа из трахеи быка; Cu,Zn-супероксиддисмутаза, выделенная из бычьих эритроцитов, со специфической (удельной) активностью 3000 Ед/мг белка производства фирмы "Sigma" (США). Бензохинон, диметилформамид, в-галактозидаза (из *E. coli*), ксантин, перекись водорода также были получены от фирмы "Sigma", ксантиноксидаза - от "Calbiochem" (США); нитротетразолий синий - от "Реанал" (Венгрия); сефадекс G-25 и сефакрил S-300 - от фирмы "Pharmacia" (Швеция). Остальные реагенты - аналитически чистые вещества отечественного производства.

Содержание белка в препаратах определялось по методу Bradford. Измерение ферментативной активности КАТ осуществляли спектрофотометрически по уменьшению поглощения (исчезновению перекиси водорода) при длине волны 240 нм (рН 7,0, комнатная температура), а СОД – по ингибированию восстановления нитротетразолия синего в системе ксантин – ксантиноксидаза, рН - 7,8. За единицу активности КАТ принимали количество фермента, необходимое для разложения 1 мкмоль перекиси водорода (при её начальной концентрации в кювете 20 мМ) за 1 мин при 25°C, рН 7,0. За единицу активности СОД принимали количество этого фермента, необходимое для подавления восстановления нитротетразолия синего на 50% в условиях эксперимента.

Модификацию КАТ хондроитинсульфатом проводили в несколько этапов [13]. На первом к 100 мг ХС, растворенного в 6 мл 0,02 М натрий-фосфатного-буфера, содержащего 0,15 М NaCl (PBS), рН 6,0, добавляли 100 мг бензохинона, предварительно растворенного в 3 мл диметилформамида. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Второй этап был связан с очисткой активированного бензохиноном ХС. На колонке с сефадексом G-25 (объем геля 40 мл) проводили разделение активированного ХС от избытка бензохинона, используя в качестве элюента 0,02 М PBS, рН 6,0. На третьем этапе осуществляли связывание КАТ с активированным ХС. Для этого в 12 мл PBS со 100 мг активированного ХС растворяли 32 мг КАТ (по белку), доводили значение рН смеси 1 М раствором Na₂CO₃ до величины 8,5 и инкубировали её при комнатной температуре в темноте в течение 20 ч. Концентрации КАТ и ХС в инкубационной смеси составляли 11 и 55 мкМ, соответственно.

Получение биферментного конъюгата КАТ с СОД [13] проводили с использованием активированного ХС, полученного и очищенного, как показано выше. К 18 мл PBS с активированным ХС (150 мг) добавляли 7,5 мг СОД (по белку), доводили рН раствором 1 М Na₂CO₃ до значения 8,7-9,0 и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре в темноте. Затем к инкубируемой смеси добавляли 20,6 мг КАТ (по белку), поддерживая рН смеси 8,7-9,0, и выдерживали её еще 20 ч в темноте при комнатной температуре. Концентрации КАТ, СОД и ХС в инкубационной смеси составляли 5,7, 15,6 и 67 мкМ, соответственно.

Получение СОД-ХС-КАТ с необратимо инактивированными формами ферментов проводили по приведенной выше схеме с предварительной инактивацией СОД и КАТ после их инкубации с 0,3 М раствором перекиси водорода (рН 7,0, 0,02 М фосфатный буфер, комнатная температура, 3 часа) и при рН 11,8-12,0 (0,05 М NaOH, комнатная температура, 2 часа), соответственно.

Выделение модифицированных форм КАТ проводили методом гель-хроматографии на колонке с сефакрилом S-300 (объем колонки 40 мл, объем фракции 1,0 мл), уравновешенной 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,5. Для наработки препаратов использовали также ультрафильтрацию инкубационной смеси или хроматографически выделенной белковой фракции (существенных различий между ними в отношении указанных параметров конечного продукта не наблюдалось) на мембране ХМ-300, промывая смесь 0,025 М PBS, рН 7,5. Промывание вели до прекращения изменения величины поглощения при 280 нм

промывных вод, составляющей менее 3% от исходного значения. Выделенные препараты лиофилизировали. Полученное производное КАТ-ХС имело весовое содержание белка 12-14%, специфическая (удельная) активность составляла 1100 Ед/мг препарата. Весовое содержание белка в производном СОД-ХС-КАТ было 4-6%, удельная СОД активность 60 Ед/мг препарата, удельная КАТ активность 140 Ед/мг препарата.

Для исследования влияния СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов использовали кровь здоровых добровольцев. Кровь получали из кубитальной вены натошак в пластиковую пробирку с 0,13 М цитратом натрия (рН 7,3). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) выделяли центрифугированием крови при 180 g в течение 15 минут. В работе не использовали бедную тромбоцитами плазму для разбавления ОТП, что позволяло свести до минимума дополнительную активацию, которая может быть вызвана вышедшими в плазму активаторами при дополнительном центрифугировании.

Агрегацию тромбоцитов оценивали с помощью лазерного двухканального анализатора агрегации "БИОЛА". Кроме традиционного метода регистрации светопропускания (метод Борна), агрегация тромбоцитов оценивалась на основании анализа флуктуаций светового потока, проходящего через образец. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему радиусу агрегатов и позволяет исследовать образование микроагрегатов, содержащих менее 100 тромбоцитов, а также устранять влияние светопоглощающей активности плазмы и процесса изменения формы тромбоцитов на точность регистрации, что особенно важно для исследования спонтанной агрегации.

Способность к образованию агрегатов малого размера (от 3 до 100 клеток) изучали по спонтанной и индуцированной 0,5 мкМ ADP, 0,5 мкМ серотонином и 1 мкМ TRAP (пептидный агонист тромбинового рецептора) агрегации с помощью метода регистрации среднего размера агрегатов (в отн. ед.). Образование агрегатов большого размера (свыше 100 клеток) в ответ на 5 мкМ ADP и 6 мкМ TRAP оценивали по Борну в % светопропускания. Исследование проводили не позднее 2 часов после взятия крови.

Адгезию оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии. 15 мкл ОТП смешивали с физиологическим раствором, H_2O_2 и/или препаратами каталазы и наносили на адгезивную поверхность (стекло), инкубировали 15 мин. при комнатной температуре в закрытом бюксе для предотвращения высыхания, осторожно отмывали в физиологическом растворе, чтобы снять неприкрепленные клетки и фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде 1,5 часа. По окончании фиксации образец обезжизивали и готовили для микроскопии.

Подсчет тромбоцитов различной формы осуществляли на 25 полях сканирования при увеличении $\times 2500$ в сканирующем электронном микроскопе "PHILIPS PSEM 550x" и выражали в процентах к общему количеству клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные нами данные подтвердили, что активные формы кислорода [14], в нашем случае перекись водорода, регулируют активацию тромбоцитов (рис. 1А). Об этом свидетельствует разный вид кривых спонтанной агрегации тромбоцитов (кривая 1 на рис. 1А) и агрегации в присутствии 300 мкМ H_2O_2 (кривая 2 на рис. 1А). Указанный концентрационный уровень H_2O_2 вполне сходен с таковым в условиях окислительного стресса, поскольку концентрация H_2O_2 в крови не более 35 мкМ [15]. Полагают, что перекись водорода в условиях нормы служит молекулой внутри- и меж-клеточной передачи сигнала, в интервале концентраций 20-50 мкМ обладает ограниченной цитотоксичностью для многих типов клеток и при физиологических условиях её концентрация более 50 мкМ считается высокой [15]. Нативная превентивно добавленная КАТ в дозе 3000 Ед существенно снижает эффект H_2O_2 (кривая 3 на рис. 1А), а конъюгат СОД-ХС-КАТ нивелирует его уже в дозе 400 ед КАТ активности (кривая 4 на рис. 1А), демонстрируя повышенную дозозависимую антиоксидантную эффективность действия в сравнении с КАТ (рис. 1Б). Сами производные КАТ и ХС не оказывают влияния на агрегацию тромбоцитов.

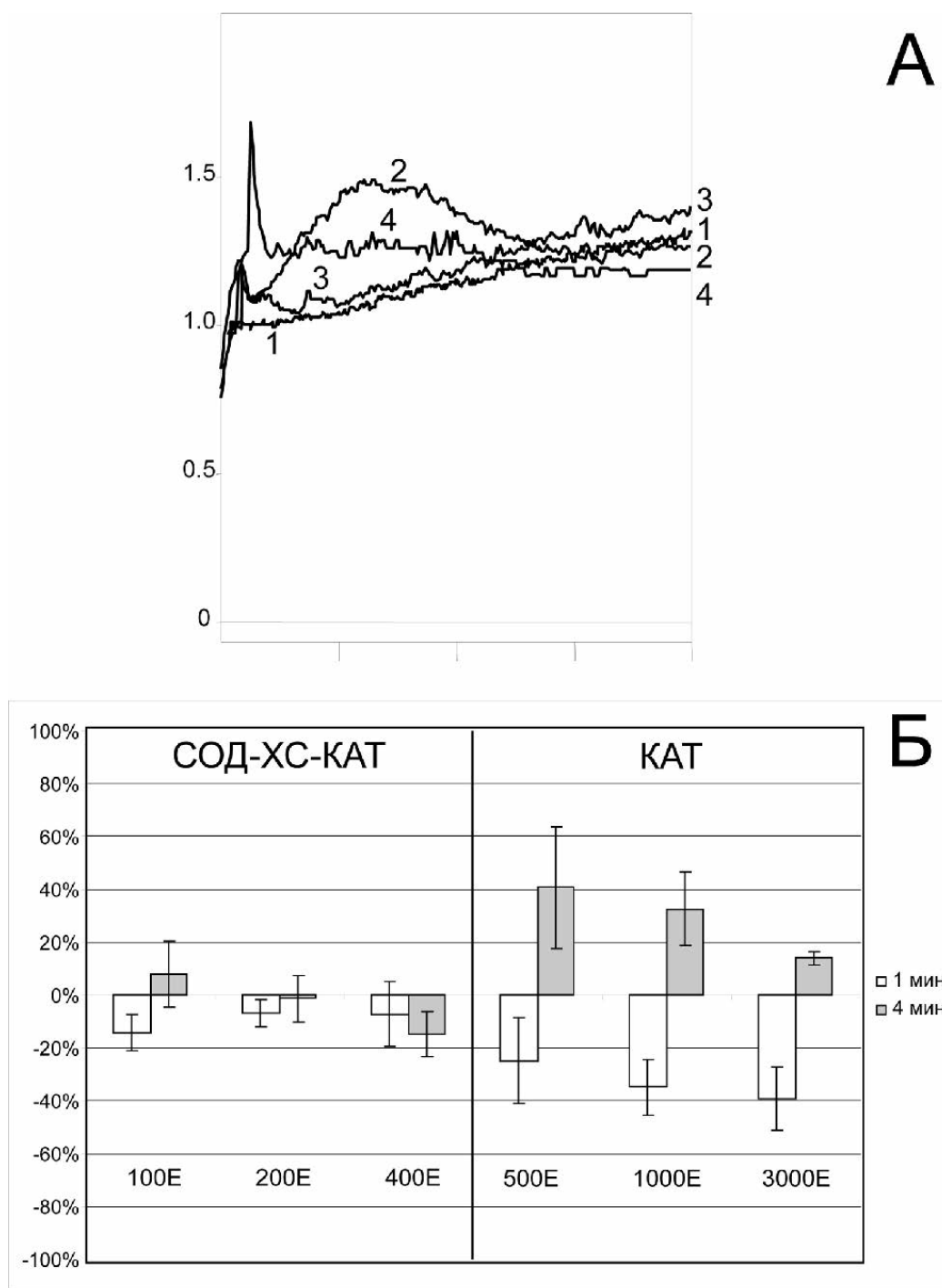


Рисунок 1.

Влияние перекиси водорода и производных КАТ и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов.
А: кривая спонтанной агрегации тромбоцитов (1), агрегации в присутствии 300 мкМ H_2O_2 (2), а также при введении сначала 3000 Ед КАТ, а затем 300 мкМ H_2O_2 (3) и сначала 400 Ед КАТ активности конъюгата СОД-ХС-КАТ, а затем 300 мкМ H_2O_2 (4).

По оси абсцисс время (мин), по оси ординат средний размер агрегатов (в отн. ед.).
Б: диаграммные данные влияния разных доз (в Ед каталазной активности) СОД-ХС-КАТ и КАТ (по указанной выше схеме эксперимента) на агрегацию тромбоцитов в присутствии 300 мкМ H_2O_2 по сравнению с показателем агрегации на первой минуте ее развития (пустые столбцы) и на четвертой минуте (закрашенные столбцы). За нулевой уровень принята обобщенная кривая агрегации тромбоцитов в присутствии 300 мкМ H_2O_2 .

Показатели (по ординате в %) выше неё положительны, ниже неё - отрицательны.

Присутствие 300 мкМ H_2O_2 усиливает активацию тромбоцитов, регистрируемую по их агрегации, вызванную разными по механизму действия индукторами – ADP, серотонином и TRAP (кривые 1, 2 и 3 на рис. 2 А,Б,В, соответственно). Превентивно введенные в ОТП 3000 ед КАТ или 400 ед КАТ-активности конъюгата СОД-ХС-КАТ предупреждают активирующее действие H_2O_2 (кривые 4 и 5 на рис. 2А,Б,В, соответственно). Применение конъюгата СОД-ХС-КАТ подтверждает его повышенную антиоксидантную активность, превосходящую действие КАТ. Эффект КАТ производных оказался дозозависимым, достигая наибольших значений (существенно не изменяющихся при дальнейшем увеличении дозы) при 3000 и 400 ед КАТ-активности, соответственно, для КАТ и СОД-ХС-КАТ.

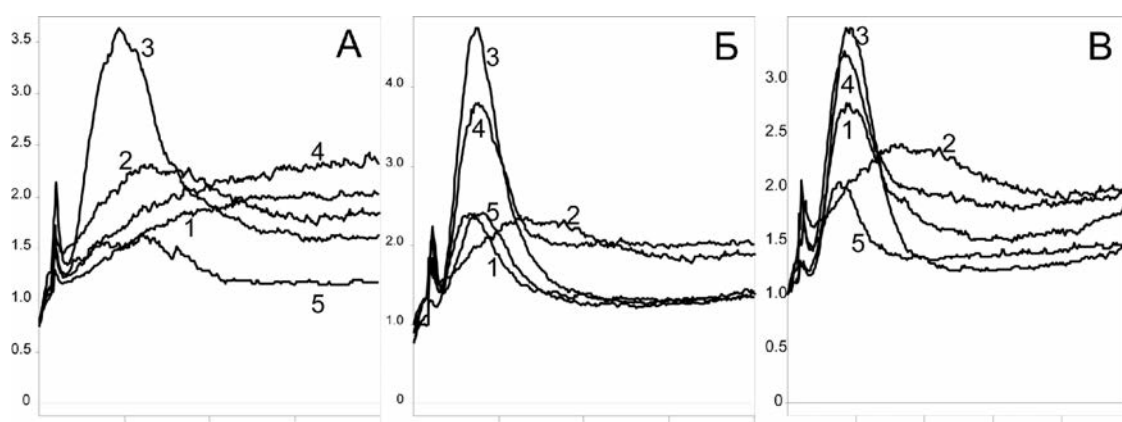


Рисунок 2.

Влияние КАТ и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную ADP (А), серотонином (Б) и TRAP (В) в присутствии H_2O_2 .

А: кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 0,5 мкМ ADP (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 0,5 мкМ ADP и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных 3000 Ед КАТ и 0,5 мкМ ADP с 300 мкМ H_2O_2 (4) и 400 Ед КАТ активности СОД-ХС-КАТ и 0,5 мкМ ADP с 300 мкМ H_2O_2 (5).

Б: кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 0,5 мкМ серотонина (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 0,5 мкМ серотонина и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных 3000 Ед КАТ и 0,5 мкМ серотонина с 300 мкМ H_2O_2 (4) и 400 Ед КАТ активности СОД-ХС-КАТ и 0,5 мкМ серотонина с 300 мкМ H_2O_2 (5).

В: кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 1 мкМ TRAP (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 1 мкМ TRAP и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных 3000 Ед КАТ и 1 мкМ TRAP и 300 мкМ H_2O_2 (4), 400 Ед КАТ активности СОД-ХС-КАТ и 1 мкМ TRAP с 300 мкМ H_2O_2 (5).

Представлены типичные кривые агрегатограмм, отобранные из 4-5 экспериментов.

По оси абсцисс указано время (мин), по оси ординат средний размер агрегатов (в отн. ед.)

Благодаря КАТ активности испытанные производные КАТ нивелировали действие H_2O_2 на тромбоциты (рис. 1 и 2). Вместе с тем, показано, что тромбоциты сами могут генерировать активные формы кислорода [14]. С этим согласуется ингибирующее действие производных СОД-ХС-КАТ на ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов (кривые 1 и 2, рис. 3), когда эффект производного КАТ-ХС был весьма умеренным, а КАТ не обладала им вовсе (данные

ДЕЙСТВИЕ БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА НА ТРОМБОЦИТЫ

не приводятся). Следует отметить влияние структурного фактора конъюгата СОД-ХС-КАТ (кривая 3 в сравнении с кривыми 1 и 2 на рис. 3), проявляющегося в отсутствии ферментативных активностей, на индуцированную АДФ агрегацию тромбоцитов. Структурный вклад в этот эффект ХС, индивидуально не проявляющего антиагрегационное действие, подчеркивался отсутствием влияния сходной с конъюгатом по молекулярным размерам β -галактозидазы, аналогично использованной в эквимолекулярных по белку концентрациях (в сравнении с СОДинкт.-ХС-КАТинкт.). Биферментный конъюгат проявлял своё антиагрегатное действие как благодаря присутствию ферментативных активностей, так и посредством своей уникальной надмолекулярной структуры, созданной с участием ХС [16].

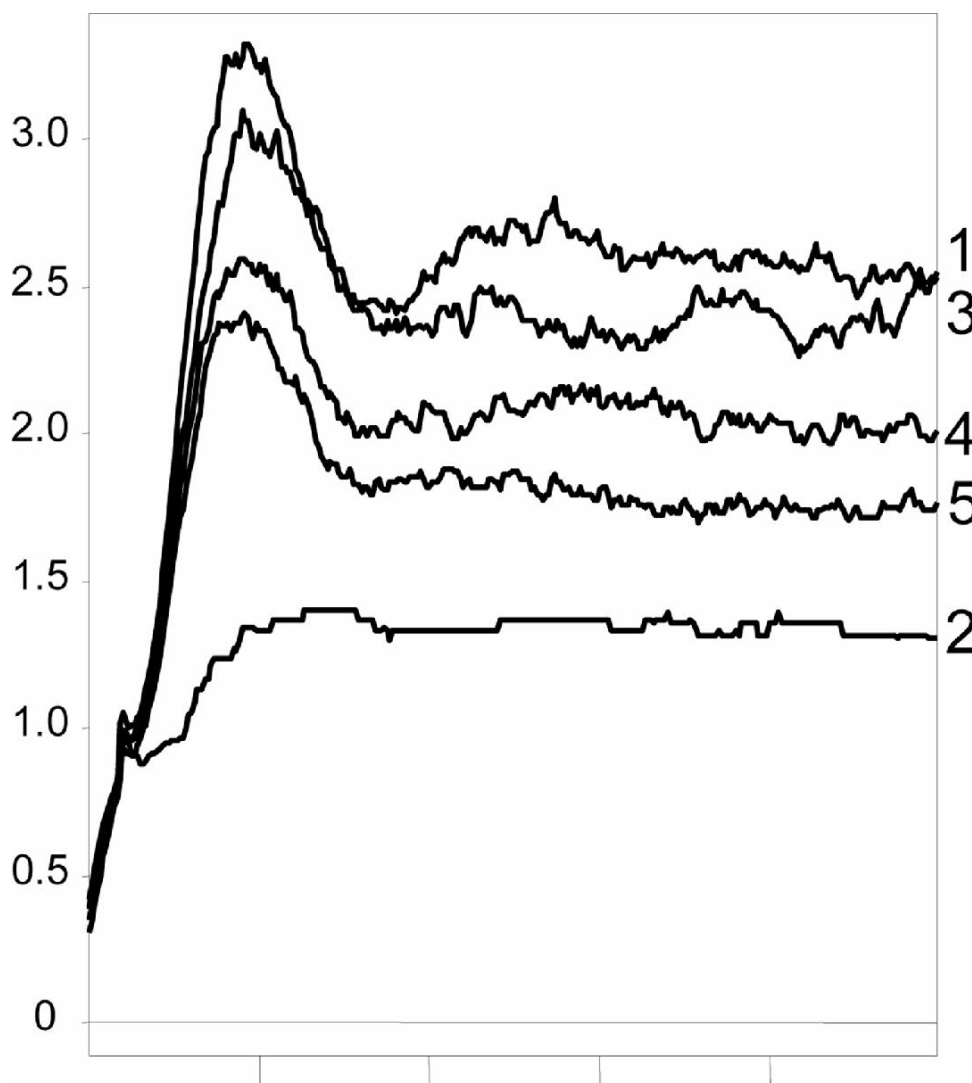


Рисунок 3.

Влияние производных СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную 0,5 мкМ АДФ.

Кривые агрегации в ответ на 0,5 мкМ АДФ (1), и превентивно введенных в эквимольных концентрациях по белку, соответствующих 400 Ед КАТ активности конъюгата СОД-ХС-КАТ: СОД-ХС-КАТ (2), СОДинкт.-ХС-КАТинкт. (3), СОД-ХС-КАТинкт. (4), СОДинкт.-ХС-КАТ (5).

Представлены типичные кривые агрегатограмм, отобранные из 3–5 экспериментов, по оси абсцисс указано время (мин), по оси ординат — средний размер агрегатов (в отн. ед.)

Отмеченный эффект проявлялся в достаточно широком диапазоне условий эксперимента. Действие СОД-ХС-КАТ проявлялось в ингибировании агрегации тромбоцитов, индуцированной различными концентрациями АДФ, серотонина, TRAP (то есть индукторами с разным механизмом действия) (рис. 4). Это новое качество СОД-ХС-КАТ, не характерное в этих условиях для его компонентов по отдельности.

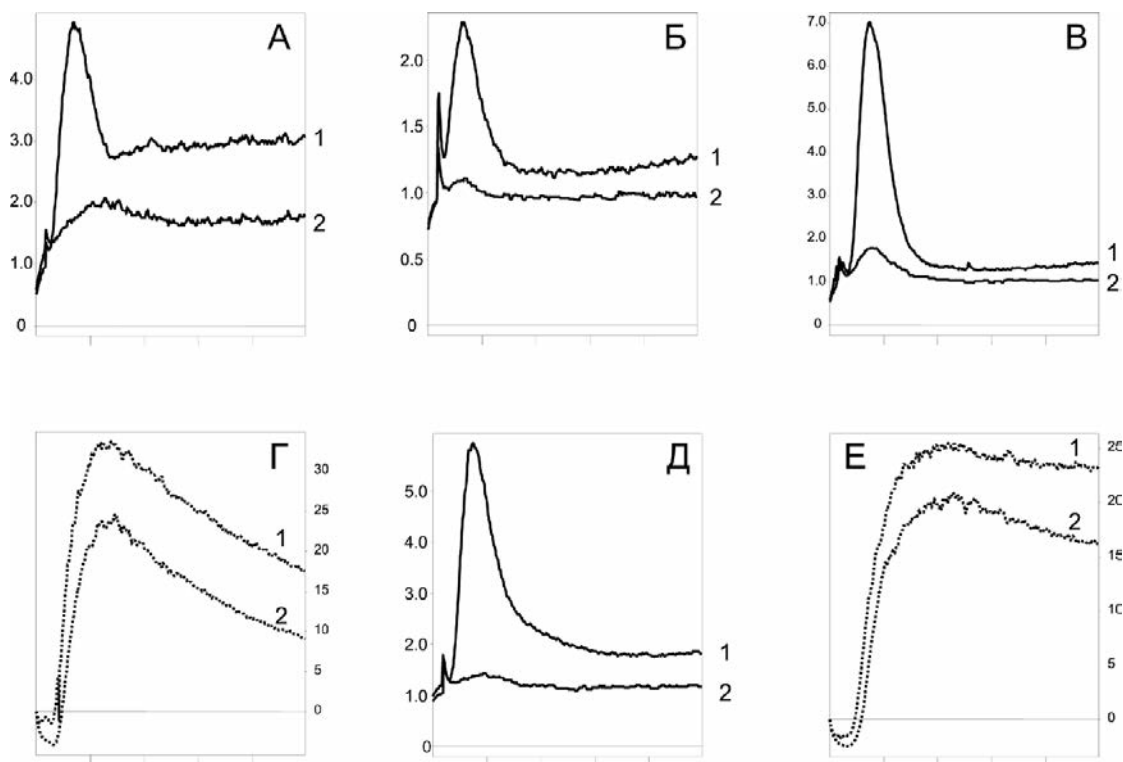


Рисунок 4.

Влияние биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ (400 Ед КАТ активности, кривая 2) на агрегацию тромбоцитов, индуцированную (кривая 1): 0,5 мкМ (А) и 5,0 мкМ (Г) АДФ; 0,5 мкМ (Б) и 5,0 мкМ (Д) серотонина; 1 мкМ (В) и 6 мкМ (Е) TRAP.

Представлены типичные кривые агрегатограмм, отобранные из 3-6 экспериментов, по оси абсцисс указано время (мин), по оси ординат средний размер агрегатов (в отн. ед., А-В, Д) или степень светопропускания (в %, Г и Е).

Распластывание тромбоцитов на адгезивной поверхности является одной из критических стадий гемостаза, индуцирующих каскад реакций, ведущих к формированию тромба. Адгезия и распастывание тромбоцитов происходит при их нанесении на стекло (фото 1 на рис. 5). В присутствии H_2O_2 количество распастанных тромбоцитов возрастает (фото 2 на рис. 5), но при предварительном добавлении конъюгата СОД-ХС-КАТ на стекло (фото 3 на рис. 5) или в ОТП (фото 4 на рис. 5) распастанные тромбоциты в образце полностью отсутствуют. Сходная картина наблюдается при нанесении ОТП с СОД-ХС-КАТ на стекло, с предварительно нанесенной H_2O_2 (фото 5 на рис. 5). При добавлении ОТП с КАТ количество распастанных тромбоцитов значительно сокращалось, но всё же иногда встречались (фото 6 на рис. 5). Вероятно, такой эффект биферментного конъюгата связан с его адгезивными и антиоксидантными свойствами, позволяющие ему, с одной стороны, защищать поверхность от адгезии тромбоцитов, а с другой, эффективно нейтрализовывать H_2O_2 , которая усиливает адгезию и распастывание тромбоцитов на стекле.

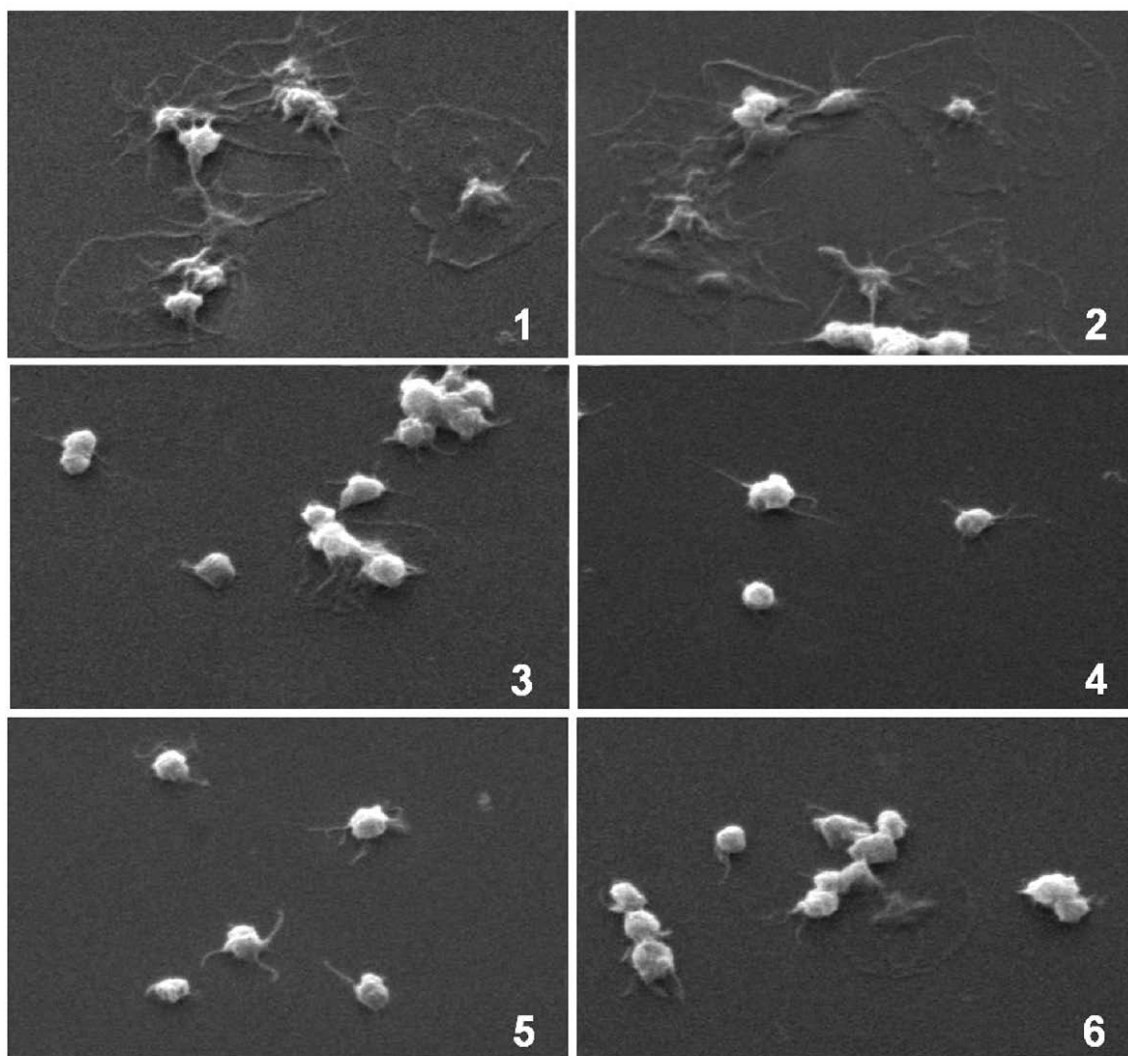


Рисунок 5.

Электронномикроскопическая картина адгезии тромбоцитов на стекле (СЭМ PHILIPS PSEM 550х, увеличение $\times 2500$). Адгезия тромбоцитов на стекле с добавлением к ОТП: физиологического раствора (1), H_2O_2 (2), СОД-ХС-КАТ (4). Адгезия тромбоцитов на стекле, предварительно обработанном: СОД-ХС-КАТ, а затем нанесение ОТП с H_2O_2 (3); H_2O_2 , а затем нанесение ОТП с СОД-ХС-КАТ (5) или ОТП с КАТ (6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Полученные результаты указывают на выраженное антиоксидантное дозозависимое действие биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ при индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии перекиси водорода. Антиагрегационная активность конъюгата СОД-ХС-КАТ достоверно выше по сравнению с другими производными КАТ и проявляется в широком интервале условий при стимулировании агрегации тромбоцитов разными по механизму действия индукторами – АДФ, серотонин, TRAP, как с H_2O_2 , так и без неё. Последнее демонстрирует новое качество антитромбоцитарного потенциала СОД-ХС-КАТ, отсутствующее у нативных, входящих в его состав ферментов и свободного ХС, и обусловленное его молекулярным составом и размерами. Такая совокупность свойств биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ

подчёркивает перспективность его биофармацевтической разработки для целей антиоксидантной терапии и продуктивность получения ферментных конъюгатов лечебного назначения.

Авторы благодарны и признательны за предоставление TRAP сотрудникам ИЭК РКНПК Росмедтехнологий Ж.Д. Беспаловой и М.Е. Палькеевой.

Настоящее исследование выполнено при частичной финансовой поддержке грантами РФФИ 09-04-00023 и 09-08-00023, а также Росмедтехнологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А.* (2008) Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания, АРТА, Новосибирск.
2. *Дубинина Е.Е.* (2006) Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток, Издательство Медицинская пресса, Санкт-Петербург.
3. *Landmesser U., Merten R., Spiekermann S., Buttner K., Drexler H., Horning B.* (2000) *Circulation*, **101**, 2264-2270.
4. *Tasaki H., Yamashita K., Tsutsui M., Kamezaki F., Kubara T., Tanaka S., Sasaguri Y., Adachi T., Nakashima Y.* (2006) *Atherosclerosis*, **187**, 131-138.
5. *Heistad D.D.* (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 689-695.
6. *Maksimenko A.V.* (2005) *Curr. Pharm. Design*, **11**, 2007-2016.
7. *Jung O., Marklund S.L., Xia N., Busse R., Brandes R.P.* (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 470-477.
8. *Gongora M.C., Qin Z., Lande K., Kim H.W., McCann L., Folz J.R., Dikalov S., Fukai T., Harrison D.S.* (2006) *Hypertension*, **48**, 473-481.
9. *Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P.* (2003) *Circ. Res.*, **93**, 622-629.
10. *Welch W.J., Chabrashvili T., Solis G., Chen Y., Gill P.S., Aslam S., Wang X., Ji H., Sandberg K., Jose P., Wilcox C.S.* (2006) *Hypertension*, **48**, 934-941.
11. *Максименко А.В.* (2007) *Хим.-фарм. журн.*, **41**(5), 3-12.
12. *Maksimenko A.V., Golubykh V.L., Tischenko E.G.* (2004) *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1463-1468.
13. *Максименко А.В., Тищенко Е.Г.* (1997) *Биохимия*, **62**(10), 1364-1368.
14. *Krotz F., Sohn H.-Y., Pohl U.* (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1988-1996.
15. *Halliwell B., Clement M.V., Long L.H.* (2000) *FEBS Letters*, **486**, 10-13.
16. *Ваваев А.В., Тищенко Е.Г., Бурячковская Л.И., Голубых В.Л., Максименко А.В.* (2007) *Кардиол. вестник*, **2/14**(1), 41-45.

Поступила: 20. 04. 2010.

**ANTIOXIDANT AND ANTIAGGREGANT EFFECTS OF COVALENT BIENZYME
SUPEROXIDE DISMUTASE – CHONDROITIN SULFATE – CATALASE CONJUGATE
IN PLATELET INTERACTIONS**

A.V. Vavaev, L.I. Buryachkovskaya, E.G. Tischenko, I.A. Uchitel, A.V. Maksimenko

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research-and-Production Complex,
3-rd Cherepkovskaya Street 15A, Moscow, 121552 Russia; tel.: +7-495-414-67-30, +7-495-414-60-25;
fax: (495) 414-66-99; e-mail: cclibr@comcor.ru

A covalent bienzyme superoxide dismutase-chondroitin sulfate-catalase conjugate (SOD-CHS-CAT) demonstrated the dose-dependent inhibitory action on induced aggregation of platelets in the presence of hydrogen peroxide. Antioxidant activity of SOD-CHS-CAT appeared at much lower doses than for other CAT derivatives. We detected the antiaggregation effect of SOD-CHS-CAT for platelet aggregation induced by ADP, serotonin, TRAP (with their different mechanism of action). Novel properties of SOD-CHS-CAT confirmed with its action against spread-eagle platelets on glass surface. The new characteristics of SOD-CHS-CAT conjugate underline the prospects of its biopharmaceutical development for antioxidant therapy.

Key words: platelets, aggregation, ADP, hydrogen peroxide, catalase, bienzyme superoxide dismutase-chondroitin sulfate-catalase conjugate.